

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

ÉCOLE DOCTORALE : COMPLEXITE DU VIVANT - ED515

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE

**Evolution des mécanismes d'accumulation et de transport de l'iode
dans les organismes marins: étude de la structure/fonction de
protéines du métabolisme iodé chez la bactérie *Zobellia
galactanivorans*.**

Par **Jean-Baptiste FOURNIER**

Dirigée par Catherine LEBLANC

Présentée et soutenue publiquement le : 16 janvier 2014

Devant un jury composé de :

Dr. David PIGNOL	CEA Cadarache	Rapporteur
Pr. Christophe DEN AUWER	Université Nice Sophia Antipolis	Rapporteur
Pr. Bernard KLOAREG	Station Biologique de Roscoff	Examineur
Dr. Arnaud GRUEZ	Université Poincaré	Examineur
Dr. Elisabeth DARROUZET	CEA Marcoule	Examinatrice
Dr. Catherine LEBLANC	Station Biologique de Roscoff	Directrice de thèse

Je dédie cette thèse à mon grand-père, Gérard FOURNIER. Il s'est attaché, au cours de mes vacances et dès potron-minet, à me faire découvrir les merveilles de la technique - du simple fonctionnement d'une résistance à la RMN.

Il m'aura ainsi transmis sa grande curiosité pour les Sciences et les Technologies. Je lui en suis reconnaissant.

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Bernard KLOAREG, directeur de la Station Biologique de Roscoff, d'avoir bien voulu accepter de présider à mon jury de thèse.

Je remercie l'école doctorale Complexité du Vivant, le programme transversal TOXNUC-E III soutenu par le CEA et la Région Bretagne d'avoir soutenu le programme MARIODE, par leurs financements, donner la chance de réaliser ces travaux de thèse. J'ai ainsi pu travailler pendant trois ans dans un cadre privilégié et j'ai pu apprécier par la même occasion le charme de la Bretagne et ses caprices météorologiques.

Je tiens à remercier mes rapporteurs et examinateurs de thèse, le Pr. Christophe DEN AUWER, le Dr. Elisabeth DARROUZET, le Dr. David PIGNOL et le Dr. Arnaud GRUEZ, d'avoir accordé de leur temps pour juger ce travail, de participer à ce jury.

Je remercie Catherine BOYEN pour son accueil au sein de son unité et m'avoir prodigué des conseils avisés et précieux. Je n'oublie pas le soutien de Catherine pour l'organisation des Journées des Jeunes Chercheurs de la SBR.

Je souhaite remercier chaleureusement, Catherine LEBLANC pour m'avoir encadré tout au long de ce projet. De m'avoir soutenu dans les moments difficiles. Je te remercie pour m'avoir transmis toutes les faces de ce métier avec toutes ses exigences. J'ai bénéficié de ta patience surtout quand il s'agissait de rédaction ou de planification de mes travaux. Je ne sais pas si c'est mieux mais je pense que s'est toujours moins pire. Je me souviendrai toujours de la pédagogie et la bienveillance dont tu m'as fait montre, tout au long de ce projet. Je t'en suis reconnaissant.

Sans Philippe POTIN, Ludovic DELAGE et Laurence CLADIERE, je ne serais pas allé au bout de cette recherche Vos nombreux conseils, votre savoir faire, les petits trucs ont fait toute la différence. Merci Ludo, pour m'avoir tout appris. J'ai pu, grâce à toi, prendre mon départ pour ce marathon qu'est une thèse. Mirjam CZJZEK, je te remercie aussi pour ta grande patience même lorsque j'étais en retard le matin et pour avoir supporté mon « humour ». Je me souviendrai de tes conseils éclairés et tout ce que tu m'as transmis durant ce séjour à Roscoff.

Merci à toi, Aurore, de m'avoir pris sous ton aile lorsque je suis arrivé à la station, de m'avoir fait découvrir les moyens de survie à Roscoff et en Bretagne. Le principal, et on l'apprend vite, ne jamais laisser mon pain à côté de ton assiette. Tu m'as aussi fait découvrir les coins les plus

charmants des côtes du Nord du Finistère. Je te remercie aussi pour nos conversations et nos rires qui ont soutenu ma motivation. Nous avons partagé de joyeux moments.

Merci à toi, Zofia de m'avoir fait découvrir que la Bretagne ce n'est pas seulement du cidre, du chouchen, des bigoudènes et des fest-noz. C'est aussi de la bière, des gavottes et plein d'autres traditions. Sans même un bâton de sourcier, nous avons, tous les deux, trouvé la source mais pas que...

Je n'oublie pas, bien sûr, Alexandra et Sophie, mes deux « mamans » qui m'ont parfois souvent remis sur le droit chemin mais qui m'auront surtout supporté et encouragé tout au long de cette aventure. Merci Alex pour m'avoir fait garder ton chien qui lui a su, se montrer reconnaissant, devant mon abnégation à le promener sous une pluie battante. Je te remercie aussi de m'avoir parfois offert de délicieux desserts qui sont, je l'avoue, bien meilleurs que mes yaourts. Sophie, je te remercie de m'avoir bichonné durant les deux derniers mois de rédaction qui auront été ardues, avec mon caractère, je le confesse, « légèrement » irascible. Mais aussi de m'avoir supporté durant ces trois années de thèse, d'avoir fait passer mes échantillons en urgence pour toutes nos autres discussions.

Je remercie tous les membres de l'unité pour leur aide, les petites discussions autour d'un café ou d'un repas ou dans les couloirs de la station. Vous m'avez tellement appris durant ces moments. Je souhaite aussi remercier, tout particulièrement, les collègues qui vagabondent de laboratoires en laboratoires et m'ont donné de leurs conseils et explications. Je crois qu'il n'y a pas eu une seule semaine où je n'ai pas eu besoin de l'un de vous et vous m'avez très souvent sorti du pétrin. Je souhaite remercier tout particulièrement, Mumu, la bonne fée des laboratoires, qui avec un simple coup de main ou de baguette magique, m'a aidé un nombre de fois, que je n'ose plus compter. Je remercie aussi Sabine pour son aide et surtout ses succulentes gaufres. J'en profite pour remercier Maryvonne qui m'aura, elle aussi, toujours sorti des difficultés administratives et a toujours pris soins de mes dossiers. Je tiens aussi à remercier les gens que j'ai pu rencontrer durant mes missions au CEA de Saclay et de Marcoule ou aux synchrotrons de SOLEIL et de Grenoble ou encore au CENBG de Gradignan. Ces rencontres ont toujours été riches d'expériences. Elles m'ont permis d'apprendre et de découvrir tant de nouvelles choses.

Je remercie aussi tous les étudiants et post-doc que j'ai pu croiser pendant 3 ans. Pour n'en citer que quelques-uns : Fred, Aliou, Alexia, Angélique, le beau Nico, Camille, Noan, Rémy, Maria, Dominique, Zhanru, Justine et Klervi. Je vous remercie pour les discussions et les rires durant les pauses cafés, les sorties et les soirées. Je crois que sans vous, il aurait été difficile de tenir cette

course. Je prends aussi le temps de remercier les autres doctorants de l'équipe que j'ai parfois malmenés, Emeline CREIS, Céline CONAN et Léa CABIOCH. Promis, je serai plus calme après ma soutenance. Merci Aga, de ta zénitude alors que je traversais les cinquantièmes gémissants de la rédaction de ma thèse. Je me souviendrai de ton charmant accent « Borat-cien ».

Mickael KUKOWITSCH, j'ai passé beaucoup de bons moments avec toi. Il est pour moi important que ton nom figure dans ma thèse. Qui aurait pu penser qu'en arrivant en Bretagne il de l'escalade sur une falaise au-dessus de la mer ou un barbecue fasse à un coucher de soleil au bord de la manche.

Wreszcie, Patrycjo, dziękuję Ci za pomoc, wsparcie i obecność przez czas trwania tego doktoratu. Oboje wiemy, że to jeszcze nie koniec... C'est court, je sais, mais difficile d'en écrire plus en polonais. Merci pour tout, ton soutien sans faille et tes petits plats.

Enfin je remercie ma famille qui m'aura poussé à aller toujours plus loin et, ma foi, je suis heureux d'en être arrivé là. Je les remercie pour m'avoir fait découvrir la vie et tellement d'autres choses, qu'il me faudra rédiger une autre thèse. J'espère qu'avant mes prochaines aventures, j'aurai un peu plus de temps à vous consacrer.

Beaucoup d'évènements ont jalonné cette aventure. Ma tête et mon cœur sont comblés de superbes souvenirs.

Merci à vous tous.

SOMMAIRE

Table des illustration	13
Liste des abréviations	17
Liste des enzymes	18

INTRODUCTION.....

20

1	Cycle biogéochimique de l'iode.....	21
1.1	Propriétés physico-chimiques et spéciation de l'iode	21
1.2	Cycle biogéochimique de l'iode	23
2	Biochimie de l'halogénéation et de la déhalogénéation	26
2.1	Généralités sur les métabolites halogénés et leurs rôles physiologiques.....	26
2.2	Métabolismes de l'iode chez l'algue brune <i>L. digitata</i> et certaines bactéries marines.....	28
2.3	Propriété de la liaison halogène.....	36
2.4	Enzymes de la déhalogénéation : exemple des déiodinases.....	36
2.5	Introduction aux enzymes de l'halogénéation.....	38
3	Les haloperoxydases à vanadium de la structure à l'exploration de leurs mécanismes catalytiques	42
3.1	Caractérisation biochimique des VHPO.....	42
3.2	Caractérisation structurale des VHPO	48
3.3	Cycle catalytique et spécificité des VHPO.....	58
3.4	Exploration des mécanismes catalytiques par des approches de mutagenèse dirigée	63
4	Présentation du projet de thèse	69
4.1	Etat de l'art sur Zg-VIPO1.....	69
4.2	Problématiques.....	75

MATERIELS ET METHODES.....

79

1	Clonages de Zg-VIPO2 et Zg-IYD.....	80
2	Mutagenèse dirigée.....	80
3	Expression hétérologue des protéines recombinantes.....	82
4	Purification des protéines recombinantes de <i>Z. galactanivorans</i> (Zg-VIPO1, Zg-VIPO2, mutants de Zg-VIPO1 et Zg-IYD).....	82
5	Analyse par gel filtration.....	83
6	Analyse du cofacteur de Zg-IYD.....	84

7	Analyses par diffusion dynamique de la lumière (DLS)	84
8	Analyse des activités enzymatiques des protéines recombinantes de <i>Z. galactanivorans</i>	85
8.1	Analyse de l'activité enzymatique haloperoxydase.....	85
8.2	Analyse de l'activité iodotyrosine déiodinase	86
	<i>Caractérisation par spectrométrie de masse des produits de la réaction enzymatique de déiodination</i>	86
	Les analyses par LC/MS pour caractériser les produits de réactions sont réalisés sur la plateforme de spectrométrie de masse MetaboMer de la Station Biologique de Roscoff.....	87
	<i>Test spectrophotométrique</i>	87
9	Analyses structurales des protéines recombinantes.....	87
9.1	Cristallogénèse.....	87
9.2	Acquisition des données de diffraction RX	88
9.3	Préparations des échantillons.....	88
9.4	Collecte des spectres d'absorbances des rayons X.....	89
10	Imagerie chimique et spéciation de l'iode chez <i>Z. galactanivorans</i> et <i>L. digitata</i>	89
10.1	Imagerie DESI-2D/TOF.....	89
10.2	Imagerie par MALDI/TOF.....	92
10.3	Imagerie par PIXE.....	94

CARACTERISATION BIOCHIMIQUE D'ENZYMES DU METABOLISME DE L'IODE CHEZ *Z. galactanivorans*: ZG-4305, UNE IODOTYROSINE DEIODINASE PUTATIVE ET ZG-2088, UNE HALOPEROXYDASE A VANADIUM PUTATIVE.....

1	Caractérisation biochimique d'une iodotyrosine déiodinase chez <i>Z. galactanivorans</i>	97
1.1.	Analyse <i>in silico</i> de la protéine Zg-4305	97
1.2.	Caractérisation biochimique de la protéine recombinante Zg-4305.....	102
2	Caractérisation biochimique d'une seconde iodoperoxydase chez <i>Z. galactanivorans</i>	112
2.1	Analyse <i>in silico</i> de Zg-2088 (Zg-VIPO2).....	112
2.2	Production de la protéine recombinante purifiée Zg-2088.....	116
2.3	Caractérisation biochimique de Zg-2088.....	117
3	Conclusions et perspectives	120

ETUDES STRUCTURE/FONCTION DE LA IODOPEROXYDASE A VANADIUM 1 DE *Z. galactanivorans*.....

1	Evolution des haloperoxydases à vanadium	124
2	Différences structurales du tunnel d'accès au site actif entre Zg-VIPO1 et Ci-VCPO	125
3	Comparaison des réseaux de liaisons hydrogène entourant le vanadate	129

4	Mutagenèse dirigée et production de mutants de Zg-VIPO1.....	133
5	Analyses enzymatiques des mutants de Zg-VIPO1.....	137
5.1	Crible de la spécificité des mutants de Zg-VIPO1.....	137
5.2	Caractérisation des paramètres catalytiques des mutants de Zg-VIPO1.....	139
6	Etudes structurales de Zg-VIPO1 et de deux mutants.....	144
6.1	Cristallogénèse des mutants Phe353His et His360Ala de Zg-VIPO1.....	144
6.2	Détermination de la structure fine du vanadate chez Zg-VIPO1 et des mutants Phe353His et His360Ala	145
7	Conclusions et perspectives	153
LOCALISATION ET SPECIATION DE L'IODE CHEZ <i>Z. galactanivorans</i> ET <i>L. digitata</i>		157
1	Etudes préliminaires de la localisation et spéciation de l'iode chez <i>Z. galactanivorans</i>	158
1.1	Analyse de la spéciation de l'iode chez <i>Z. galactanivorans</i> par DESI-TOF.....	158
1.2	Distribution et localisation de l'iode chez <i>Z. galactanivorans</i>	159
2	Distribution et spéciation de l'iode chez <i>L. digitata</i>	160
2.1	Imagerie et spéciation chimique par spectrométrie de masse chez <i>L. digitata</i>	160
2.2	Distribution chimique de l'iode par PIXE chez <i>L. digitata</i>	162
3	Discussions et perspectives.	164
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		167
1	Nouvelles enzymes impliquées dans le métabolisme iodé et rôles potentiels chez <i>Z. galactanivorans</i>	168
2	Evolution du métabolisme iodé chez les organismes vivants.....	170
3	Mécanismes moléculaires contrôlant la spécificité chez les haloperoxydases à vanadium.....	172
ANNEXE		176
BIBLIOGRAPHIE		202

Table des illustration

Figure I.1 – Diagramme de Pourbaix de l'iode dans l'eau en fonction du potentiel rédox (Eh) et du pH. La concentration totale en élément est de 10^{-10} M [Takeno, 2005].....	22
Figure I.2 – Cycle biogéochimique de l'iode. L'état d'oxydation de l'iode est présenté entre parenthèses.....	25
Figure I.3 – Présentation de l'algue <i>Laminaria digitata</i> , de son cycle de reproduction (A), de la morphologie d'un thalle de sporophyte adulte (B) et juvénile (C)..	29
Figure I.4 – Section transversale d'une lame de <i>L. digitata</i> (gauche) et de la région centrale du stipe.....	30
Figure I.5 – Distribution de l'iode chez les sporophytes de <i>L. digitata</i> dans l'ensemble de la plante, dans une coupe de stipe et dans une coupe de lame observée par imagerie multi-élémentaire quantitative d'émission X.	31
Figure I.6 – Mécanisme d'accumulation de l'iode, de détoxication du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et de production de composés impliqués dans la défense chimique.....	32
Figure I.7 – La bactérie marine <i>Z. galactanivorans</i> a été isolée de l'algue rouge <i>Delesseria sanguinea</i> et forme sur gel d'agar des colonies jaune-orangées.....	34
Figure I.8 – Visualisation en 3D du biofilm de <i>Z. galactanivorans</i> en présence d'exsudats de <i>L. digitata</i> . Biofilm témoin formé en milieu de culture ZoBell.....	35
Figure I.9 – Accumulation d'iode chez <i>Z. galactanivorans</i>	36
Figure I.10 – Déiodation catalysée par l'iodotyrosine déiodinase et par l'iodothyronine déiodinase.....	37
Figure I.11 – Centre rédox présent dans différents sites actifs des haloperoxydases à hème ou dépendante du vanadium.	39
Figure I.12 – Réactions enzymatiques des haloperoxydases.	39
Figure I.13 – Représentation schématique de l'halogénéation de la monochlorodimédone et du bleu de thymol, catalysée par les haloperoxydases à vanadium.....	45
Figure I.14 – Structures tridimensionnelles du monomère de VCPO de <i>C. inaequalis</i> , de l'homodimère VBPOI de <i>A. nodosum</i> et de deux VBPO homododécamériques de <i>C. officinalis</i> et de <i>C. pilulifera</i>	50
Figure I.15 – Comparaison des motifs centraux de VCPO de <i>C. inaequalis</i> et VBPOI de <i>A. nodosum</i>	51
Figure I.16 – Structure du site actif de l'isoforme 1 de la VBPO d' <i>A. nodosum</i> , de la CPO de <i>C. inaequalis</i> et de la VBPO de <i>C. pilulifera</i>	53

Figure I.17 – Structure des sites actifs de l'acide phosphatase de <i>E. blattae</i> et de <i>Salmonella typhimurium</i> . Superposition avec le site actif de la VCPO isolée de <i>C. inaequalis</i>	55
Figure I.18 – Centre catalytique de la VCPO de <i>C. inaequalis</i> sous la forme native et la forme peroxy-vanadate obtenue par cristallographie.....	58
Figure I.19 – Cycle catalytique hypothétique des haloperoxydases dépendantes du vanadium.	59
Figure I.20 – Mécanisme hypothétique du changement de spécificité chez les VHPO.....	66
Figure I.21 – Formation d'une région positive (δ^+) par les résidus Phe397 et Trp350 chez Ci-VCPO.....	67
Figure 22 – Alignement multiple partiel des séquences en amino-acides des VHPO isolées de <i>Z. galactanivorans</i> , de <i>C. inaequalis</i> , d' <i>A. nodosum</i> et de <i>C. pillulifera</i>	71
Figure I.23 – Analyse de la spécificité de Zg-VIPO1 par un test <i>o</i> -dianisidine en gel natif.....	72
Figure I.24 - Structure tridimensionnelle de Zg-VIPO1.....	73
Figure I.25 – Obstruction de la cavité du site actif par une boucle chez Zg-VIPO1.....	73
Figure I.26 – Comparaison des structures secondaire des VHPO.....	74
Figure I.27 - Structure du site actif de Zg-VIPO1 et Ci-VCPO.	74
Figure 28 – Analyse phylogénétique de VHPO.....	75
Figure II.29 - Courbe de calibration de la colonne Superdex 200	84
Figure III.30 - Résultat de l'analyse de la séquence protéique de Zg-4305 sur le serveur CDD.....	97
Figure III.31 - Alignement de Zg-4305 avec les iodotyrosine déiodinases	99
Figure III.32 – Thréonine 233 impliquée dans la liaison de la FMN.....	100
Figure III.33 – Analyse phylogénétique simplifiée des iodotyrosines déiodinases.....	101
Figure III.34- Purification de Zg-4305. Profil d'élution de la protéine Zg-4305 sur colonne d'affinité au nickel.	103
Figure III.35 – Chromatogramme de gel filtration obtenue pour Zg-4305.....	104
Figure III.36 - Fractions collectées lors de la chromatographie d'affinité.....	105
Figure III.37 – Spectre d'absorbance des FMN, FAD, Riboflavine et de la fraction soluble de Zg-4305 après précipitation.	105
Figure III.38 - Spectre de masse en mode négatif de la fraction soluble de Zg-4305 après précipitation des protéines par chauffage.....	106
Figure III.39 – Structure chimique de la flavine mononucléotide.	106
Figure III.40 - Spectres d'absorbance de 230 à 800 nm des différentes tyrosines halogénées, nicotinamides et flavines.	108
Figure III.41 - Spectre d'absorbance de Zg-4305 en présence de DIT et dithionite.....	109
Figure III.42 – Chromatogrammes des ions caractéristiques de la tyrosine.....	110

Figure III.43 - Diagramme de phase présentant les conditions nécessaires à la cristallisation d'une protéine par diffusion de vapeur.....	111
Figure III.44 - Cristal de la protéine Zg-4305 obtenue dans une goutte suspendue et fragment du cristal monté sur une boucle.....	112
Figure III.45 - Contexte génétique des gènes annotés codant pour des VHPO.....	114
Figure III.46 - Alignement partiel de la séquence protéique de Zg-2088 avec des VHPO caractérisées biochimiquement.....	115
Figure III.47 - Analyse phylogénétique des VHPO..	116
Figure III.48 - Purification de Zg-2088.....	117
Figure III.49 - Crible de la spécificité de Zg-2088 par test o-dianisidine en gel natif et par test fondé sur le bleu de thymol.....	118
Figure III.50 - Effet inhibiteur de l'iodure sur l'activité des enzymes Zg-VIPO1 et Zg-VIPO2.....	119
Figure IV.51 - Arbre de maximum de vraisemblance (PML) construit à partir d'un alignement multiple de 122 VHPO et 5 phosphatases acides non spécifiques.....	125
Figure IV.52 - Taille du tunnel d'accès au site actif de Zg-VIPO1 et Ci-VCPO.....	126
Figure 53 - Composition du tunnel d'accès au site actif de Zg-VIPO1 et Ci-VCPO..	127
Figure IV.54 - Zg-VIPO1 possède une boucle obstruant l'accès du site actif.....	129
Figure IV.55 - Réseaux de liaisons hydrogènes autour du site actif de Zg-VIPO1, de Ci-VCPO et de An-VBPO1.....	131
Figure IV.56 - Conservation de l'acide aspartique chez les VHPO.....	133
Figure IV.57 - Protocole pour supprimer par PCR la boucle obstruant le site actif chez Zg-VIPO1.....	135
Figure IV.58 - Purification des mutants Zg-VIPO1 Phe353His et Ser358Ala par chromatographie d'affinité.....	136
Figure IV.59 - Contrôle de la pureté des protéines mutantes de Zg-VIPO1.....	137
Figure IV.60 - Crible de la spécificité des mutants de Zg-VIPO1.....	138
Figure IV.61 - Réseau de liaison hydrogène entre His360, l'Arg410 et le vanadate chez Zg-VIPO1.....	141
Figure IV.62- Représentation du site actif de Zg-VIPO1 et de l'hélice α comportant les résidus Trp321 et Lys324.....	142
Figure IV.63 - Cristaux des mutants His360Ala et Phe353His obtenus dans une goutte suspendue...	145
Figure IV.64 - Spectres XANES au seuil K du vanadium de Zg-VIPO1 en présence ou non de peroxyde d'hydrogène et des mutants Phe353His et His360Ala.	147
Figure IV.65 - Comparaison des spectres XAS au seuil K du vanadium de Zg-VIPO1 et d'une solution de sodium orthovanadate à 5 mM.....	148

Figure IV.66 - Spectre XAS au seuil K du vanadium de l'enzyme recombinante Zg-VIPO1 sous la forme native ou peroxovanadate.	149
Figure IV.67- Spectres XANES théorique modélisés à partir du modèle structural du vanadate chez Ci-VCPO, An-VBPO1 et de la structure 3D du vanadate obtenue par diffraction des rayons X pour Zg-VIPO1, comparés au spectre expérimental obtenu pour Zg-VIPO1	150
Figure IV.68 - Spectres XANES théoriques obtenus pour Zg-VIPO1 en modifiant la distance d'un oxygène équatorial de 1,5 Å à 2,0 Å.....	151
Figure IV.69- Transformés de Fourier d'An-VBPO1 et Zg-VIPO1 sauvage et mutantes sous la forme vanadate et peroxovanadate.....	152
Figure V.70 - Analyse de la spéciation et de la répartition de l'iode chez <i>L. digitata</i>	161
Figure V.71 - Distribution et spéciation de l'iode d'une section transversale de stipe d'un individu adulte et sur la lame d'une plantule de <i>L. digitata</i>	162
Figure V.72 - Distribution élémentaire d'une section transversale de stipe de <i>L. digitata</i>	163
Figure V.73 - Distribution élémentaire d'une section transversale de stipe dans une plantule et une plante adulte chez <i>L. digitata</i>	164
Figure VI.74 – Modèle hypothétique des voies impliquant les enzymes liées au métabolisme de l'iode chez <i>Z. galactanivorans</i>	170
Figure VI.75 – Présence de métabolisme halogéné et plus spécifiquement iodé au sein de l'arbre du vivant.....	171

Liste des abréviations

AcP :	Acide phosphatase non spécifique	PIXE :	Emission de rayon X induit par des particules chargées (Particle-induced X- ray Emission)
BDT :	BigDye Terminator	RDB :	Spectroscopie de rétrodiffusion de Rutherford (Rutherford backscattering spectrometry)
CLUHP :	Chromatographie liquid à ultra haute pression (<i>Ultra high pressure liquid chromatography</i>)	RMN :	Résonance magnétique nucléaire
CONVI :	Coposé organique non volatil iodé (<i>Non-volatile dissolved organic iodine</i>)	SBR :	Station Biologique de Roscoff
COVH :	Composé organique volatil halogéné (<i>Volatile halogenated organic compounds</i>)	SDS-PAGE :	Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
COVI :	Composé organique volatil iodé	SIMS :	Spectrométrie de masse à ionisation secondaire (secondary ion mass spectrometry)
DESI :	Désorption ionization par électronébulisation (<i>Desorption electrospray ionization</i>)	STIM :	Scanning transmission ion microscopy
DFT :	Théorie de la fonctionnelle densité (<i>Density functional theory</i>)	T3 :	Triiodothyronine
DBrT :	3,5-dibromo-L-tyrosine	T4 :	Thyroxine
DCIT :	3,5-dichloro-L-tyrosine	TB :	Bleu de thymol (Thymol Blue)
DIT :	3,5-diiodo-L-tyrosine	TH :	Hormones thyroïdiennes
DLS :	Diffusion dynamique de la lumière (<i>Dynamic light scattering</i>)	TOF :	Spectromètre temps de vol (Time of flight)
DRX :	Diffraction des rayons X	UHPLC :	Chromatographie liquide à ultra haute pression (Ultra high pressure liquide chromatographie)
DTT :	Dithiothréitol	UV :	Ultra-violet
EC :	<i>Enzyme Classification</i>	Vm :	Volume mort
ERO :	Espèces réactives de l'oxygène	VBPO :	Bromoperoxydase à vanadium
EXAFS :	Spectroscopie d'absorption des rayons X étendue à la structure fine (<i>Extended X-Ray Absorption Fine Structure</i>)	VCPO :	Chloroperoxydase à vanadium
FAD :	Flavine adénine dinucleotide	Ve :	Volume d'élution
FMN :	Flavine mononucléotide	VHPO :	Haloperoxydase à vanadium
G6-Pase :	Glucose-6-phosphatase	VIPO :	Iodoperoxydase à vanadium
GG :	Polymère d'acide α -L-gulonique	WT :	Type sauvage (Wild type)
HPO :	Haloperoxydase	XANES :	Spectroscopie de structure près du seuil d'absorption des rayons X (X-ray Absorption Near Edge Structure)
ID :	Iodothyronine déiodinase	XAS :	Spectroscopie d'absorption des rayons X (X-ray absorption spectroscopy)
IYD :	Iodotyrosine déiodinase		
Km :	Constante d'affinité		
kcat :	Constante catalytique		
LC/MS :	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (Liquid chromatography mass spectrometry)		
MALDI :	Désorption ionisation laser assistée par matrice (Matrix assisted laser desorption)		
MCD :	Monochlorodimédone		
MIT :	Monoiodotyrosine		
NADH :	Nicotinamide adénine dinucléotide		
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate		
PCR :	Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase chain reaction)		
PDB :	Protein Data Bank		
PEG :	Polyéthylène glycol		
PM :	Poids moléculaire		

Liste des enzymes

- An-VBPO : Bromoperoxydase à vanadium d'*Ascophyllum nodosum*
Ci-VCPO : Chloroperoxydase à vanadium de *Curvularia inaequalis*
Co-VBPO : Bromoperoxydase à vanadium de *Corallina officinalis*
Cp-VBPO : Bromoperoxydase à vanadium de *Corallina pilulifera*
Eb-AcP : Acide phosphatase d'*Escherichia blattae*
Gc-VBPO : Bromoperoxydase à vanadium de *Gracilaria changii*
Hs-G6P : Glucose-6-phosphatase d'*Homo sapiens*
Hs-IYD : Iodoperoxydase à vanadium d'*Homo sapiens*
Ld-VBPO : Bromoperoxydase à vanadium de *Laminaria digitata*
Ld-VIPO : Iodoperoxydase à vanadium de *Laminaria digitata*
Mm-IYD : Iodoperoxydase à vanadium d'*Homo sapiens*
St-AcP : Acide phosphatase de *Mus musculus*
Zg-IYD : Iodotyrosine déiodinase de *Zobellia galactanivorans*
Zg-VIPO : Iodoperoxydase à vanadium de *Zobellia galactanivorans*

1 Cycle biogéochimique de l'iode

1.1 Propriétés physico-chimiques et spéciation de l'iode

L'iode (I) (numéro atomique 53) est un élément rare qui a été découvert il y a deux siècles (cf. **Encart 1**). Il appartient, dans le tableau périodique, des éléments au groupe des halogènes (ou groupe 17) dont les autres membres sont le fluor, le chlore, le brome et l'astate. Cet élément partage les caractéristiques physico-chimiques typiques de ce groupe, comme par exemple une électronégativité forte et une configuration de valence p^{n-1} . L'iode est le moins électronégatif des halogènes, il est donc moins réactif que le fluor, le chlore et le brome. Cependant, son électronégativité reste suffisante pour faire de lui un agent oxydant.

L'iode possède 37 isotopes identifiés ; parmi lesquels seul ^{127}I est stable. Les radio-isotopes les plus couramment rencontrés sont regroupés dans le **tableau I.1**. L'isotope ^{129}I a la demi-vie la plus longue et est produit soit lors de la fission de l'uranium 235, soit par l'interaction de rayons cosmiques avec des atomes de xénon. La principale source d'émission dans l'environnement de ce radio-isotope est l'industrie nucléaire, en particulier lors d'essais et d'accidents nucléaires, tels que Tchernobyl ou Fukushima. Ainsi, depuis la période pré-nucléaire, le ratio $^{129}\text{I}/^{127}\text{I}$ a augmenté d'un rapport de 3 à 8 suivant les régions. Les isotopes ^{131}I et ^{125}I avec une durée de demi-vie courte sont utilisés en médecine comme éléments traceurs ou en radiothérapie. A la différence de l'isotope ^{125}I , l'isotope 131 est particulièrement cancérigène à cause de sa radioactivité β^- , dont le rayonnement provoque des mutations génétiques.

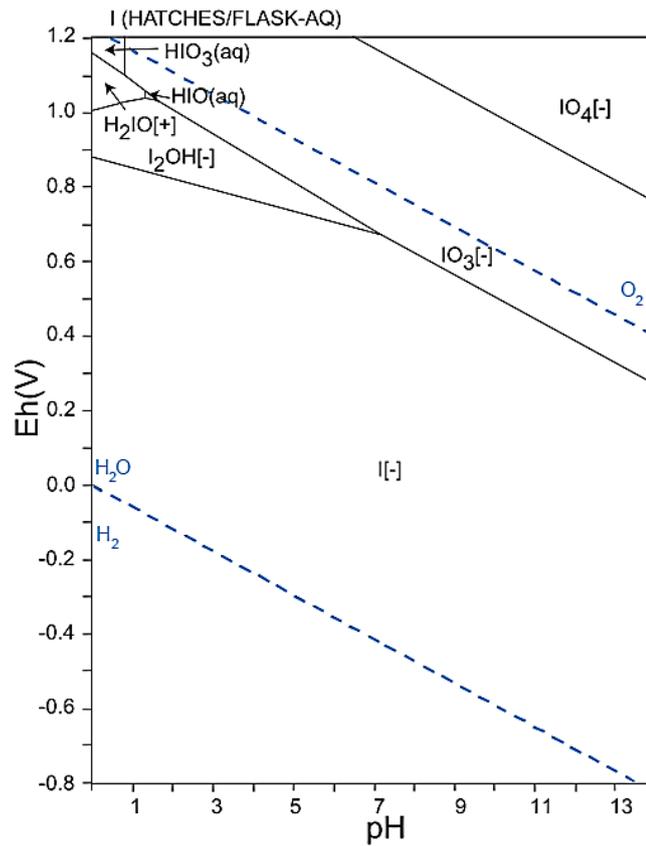
Tableau I.1 – Propriétés des quatre isotopes principaux de l'iode.

Isotope	Période	Type d'émission	Activité (Bq/g)
^{123}I	13,2 h	α, γ	$7,14 \cdot 10^{16}$
^{125}I	59,9 j	α, γ	$6,45 \cdot 10^{14}$
^{129}I	$1,57 \cdot 10^7$ a	β^-	$6,53 \cdot 10^6$
^{131}I	8,0 j	β^-, γ	$4,61 \cdot 10^{15}$

L'état d'oxydation de l'iode dans les composés est compris entre (-1) et (+7) et explique la grande diversité des espèces iodées existantes. La spéciation de l'iode dépend aussi de nombreux paramètres physico-chimiques (pH, température, électronégativité, composition,...) et il est important de pouvoir l'évaluer afin de connaître la biodisponibilité de

cet élément. Dans l'eau, l'iodure (I^-) («état d'oxydation -1), le diiode (I_2) (0) et l'iodate (IO_3^-) (+5) sont les espèces inorganiques prédominantes (**Figure I.1**). Dans l'atmosphère, la spéciation et les états d'oxydation de l'iode sont très variés et sa chimie est très complexe [pour revue: Saiz-Lopez *et al.*, 2012].

Figure I.1 - Diagramme de Pourbaix de l'iode dans l'eau en fonction du potentiel rédox (Eh) et du pH. La concentration totale en élément est de 10^{-10} M [Takeno, 2005]



Encart 1

Découverte de l'iode dans les cendres d'algue



Un four à pierre utilisé par les goémoniers pour brûler des algues séchées et produire des briques de soude sur la côte nord de la Bretagne (Lanildut) (photo de gauche). Champ d'algue à marée basse près de Roscoff composé principalement de *Laminaria digitata* (image de droite).

Il y a deux siècles, en 1811, Bernard Courtois (salpêtrier et chimiste français) a découvert ce nouvel élément dans les cendres d'algues (soude de varech). Durant cette période de guerres napoléoniennes, ce chimiste français recherchait des sources alternatives pour produire du salpêtre et il observa l'émission de vapeur violette après l'addition d'acide sulfurique concentré sur des cendres d'algues. C'est seulement deux années plus tard, en 1813, que cette découverte fut publiée dans les annales de Chimie, et que le nom iode fut donné à cet élément (du grec *ιώδης* signifiant violet) [Courtois, 1813]. Quelques années plus tard, le chimiste Gay-Lussac présenta ses propres résultats sur l'iode et démontra que ce nouvel élément appartenait à un nouveau groupe d'élément, les halogènes [Gay-Lussac, 1813*a,b*]. En parallèle aux recherches sur les propriétés des halogènes, l'utilisation de l'iode a rapidement trouvé des applications pour le traitement des blessures ainsi qu'en chirurgie.

Actuellement, l'iode est utilisé dans de nombreux domaines, comme l'imagerie médicale, la radiothérapie, la photographie ou comme agent colorant. La production d'iode à partir d'algues devint une activité économique majeure dans les régions côtières d'Europe, en particulier en Bretagne, Normandie, Irlande et Ecosse jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle. L'iode est actuellement extrait principalement des mines de salpêtre naturel associé aux dépôts de caliche (roche sédimentaire) au Chili. Cet élément peut aussi être extrait d'eaux souterraines hypersalines qui sont associées aux dépôts naturels de gaz et pétrole au Japon et aux États-Unis.

1.2 Cycle biogéochimique de l'iode

Sur Terre, l'iode (I) fait partie des éléments traces (60^{ème} rang en terme d'abondance dans la croûte terrestre). Malgré sa rareté, il joue un rôle important dans le métabolisme de nombreux organismes vivants (cf. **partie 1.2**). Sa répartition est très inégale sur Terre (**Tableau 1.2**) et c'est dans les océans que l'iode se trouve en plus fortes concentrations et quantités. Dans les sols, les rivières et les roches les quantités sont beaucoup plus faibles.

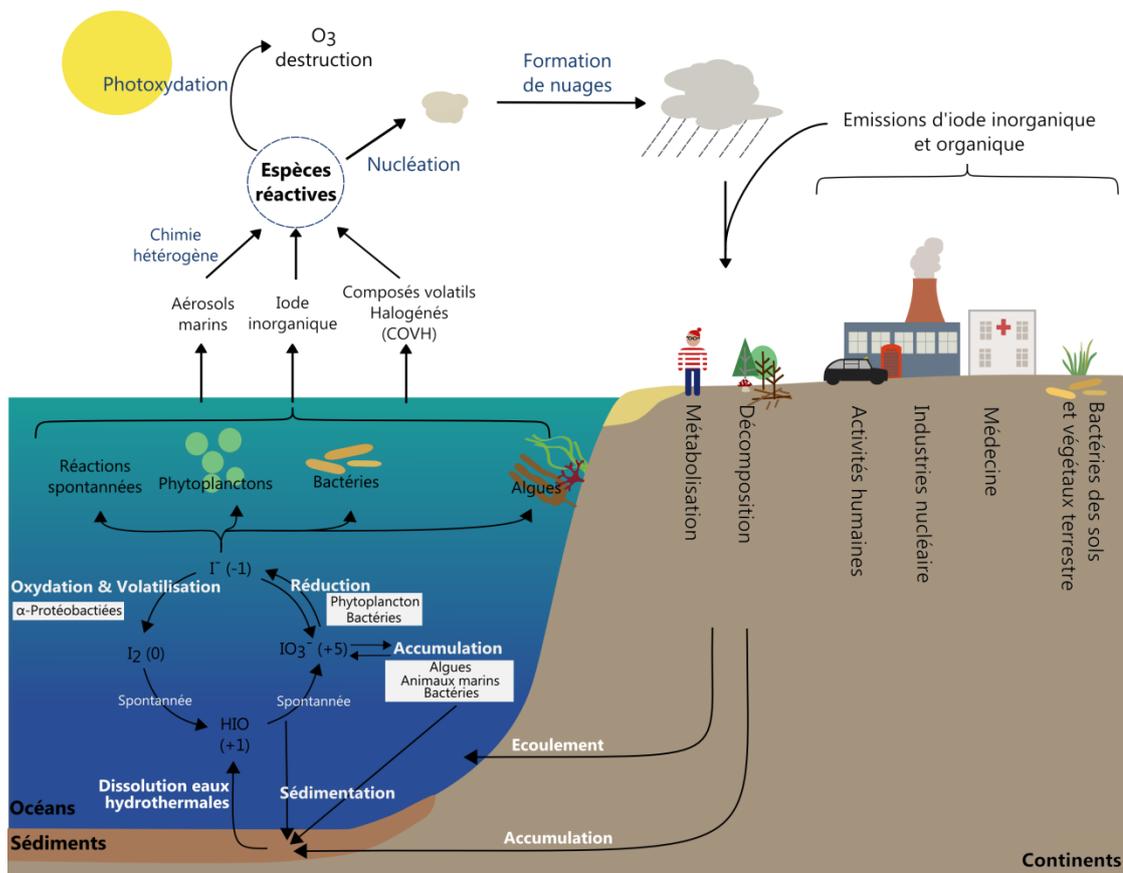
Dans l'environnement l'iode subit de nombreuses transformations bio-catalysées ou spontanées qui sont à l'origine du cycle biogéochimique de l'iode (**Figure I.2**). La compréhension de ce cycle est importante pour deux raisons clés. **(1)** L'iode est essentiel au fonctionnement de la glande thyroïde chez les mammifères et est concentré de manière très importante au niveau de cet organe. Un déficit de cet élément engendre des pathologies (ex : crétinisme, hypothyroïdie). **(2)** Lors d'accidents nucléaires des isotopes radioactifs de l'iode sont émis en grande quantité dans l'environnement, comme en mars 2011 à Fukushima-Daiichi au Japon. Il est important de connaître leurs devenir dans l'environnement pour appréhender les impacts sur la santé humaine. Par exemple, des études épidémiologiques ont clairement montré un impact sur la santé humaine de l'accident de Tchernobyl (Avril 1986, Ukraine) et en particulier une augmentation des cancers de la thyroïde chez les enfants. La contamination de l'environnement par l'iode radioactif a aussi un impact dramatique sur d'autres organismes et également sur le long terme du fait de l'accumulation de I^{129} . Dans le cas de Fukushima-Daiichi, l'accident est à l'origine d'une pollution importante de l'océan impactant directement les organismes marins.

Tableau I.2 – Distribution de l'iode dans différents compartiments sur Terre.

Environnement	Concentration Iode ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Océans	45 – 60
Sols	2 – 10
Rivières	0.5 – 20
Roches	0.3

Dans l'océan la concentration moyenne en iode est de l'ordre de $0,5 \mu\text{M}$ mais sous diverses formes chimiques. Dans l'eau de mer le pH, la température, la force ionique et la profondeur jouent un rôle important dans la spéciation de l'iode tout comme l'action d'organismes vivants [Wong *et al.*, 2002; Chance *et al.*, 2007; Amachi, 2008]. Les formes inorganiques principales de cet élément dans l'océan sont l'iodure et l'iodate avec des concentrations comprises respectivement entre $<0,1$ et $0,45 \mu\text{M}$ et entre $0,01$ et $0,3 \mu\text{M}$ [Wong, 1991]. La forme majoritaire dans la couche d'eau comprise entre 0 et -100 m est I^- (> 50%) puis I^- diminue de manière importante en profondeur où IO_3^- devient majoritaire. Dans les zones côtières et les estuaires, les composés organiques non-volatils de l'iode (CONVI) peuvent être aussi significatifs en terme de quantité [Wong and Cheng, 2008].

Figure I.2 – Cycle biogéochimique de l'iode. L'état d'oxydation de l'iode est présenté entre parenthèses.



La présence de l'iode dans l'atmosphère marine fut établie dans les années 1970 et provient en grande partie d'émissions océaniques. L'iode est émis vers l'atmosphère sous forme organique ou inorganique. Certaines émissions peuvent être d'origine abiotique et ont lieu à l'interface entre l'eau et l'air, comme la formation spontanée d' I_2 suite à la réaction avec l'ozone (O_3) [Garland, 1981; Martino *et al.*, 2009].

Dans les régions côtières il existe de très fortes émissions d' I_2 volatil mais aussi de composés organiques volatils halogénés (COVH) (ex : iodométhane (CH_3I) ; diiodométhane (CH_2I_2)) [Carpenter *et al.*, 2000; Palmer *et al.*, 2005; Saiz-Lopez *et al.*, 2006; Paul and Pohnert, 2011]. Ces émissions sont associées à des réponses antioxydantes de certaines algues qui lors de leur exposition à marée basse sont soumises à un stress oxydant [O'Dowd *et al.*, 2002; Küpper *et al.*, 2008]. En pleine mer les émissions d'iode ou COVH sont plutôt associées au métabolisme des microalgues [Moore *et al.*, 1996; Itoh, 1997; Baker *et al.*, 2000]. Certains organismes du phytoplancton sont capables de réduire les nitrates en ammoniacque à l'aide de nitrate-réductases et ces enzymes pourraient aussi réduire l'iodate en iodure [Wong and

Cheng, 2001; Chance *et al.*, 2007]. Certaines bactéries semblent aussi être impliquées dans ce cycle biogéochimique de l'iode par la formation de CH_3I ou par la concentration de cet élément [Amachi *et al.*, 2001, 2005a, 2007b]. Enfin il a été montré que des bactéries étaient aussi capable de réduire l' IO_3^- en I^- [Farrenkopf *et al.*, 1997b; Amachi *et al.*, 2007a].

Dans l'atmosphère, l'iode présent sous forme inorganique (I_2 , IO_2 ,...) ou organique (COVH : CH_3I , CH_2I_2 ,...) à durée de vie relativement courte [pour revue: Saiz-Lopez *et al.*, 2012] est capable de réagir plusieurs fois avec l' O_3 afin de former des molécules de plus haut poids moléculaire (OIO , I_2O_4 , I_2O_5 , etc). Celles-ci peuvent éventuellement former des particules de l'ordre du nanomètre qui constituent des points de nucléation de l'eau puis de nuage (**Figure I.2**) [Lee *et al.*, 2010]. L'iode ainsi que les autres halogènes jouent un rôle important dans la destruction de l' O_3 dans la troposphère (atmosphère terrestre de 0 à 8 km) et pourraient être responsables d'environ 40% de cette dégradation [Read *et al.*, 2008; Mahajan *et al.*, 2010].

Lors de précipitations, l'iode est déposé sur les régions émergées où il peut être accumulé et métabolisé par les organismes vivants. Il a ainsi été montré que certains microorganismes terrestres étaient capables d'émettre des COVH [Amachi *et al.*, 2003; Bannai *et al.*, 2006]. La sédimentation de cet élément provient de la décomposition des organismes vivants. L'iode peut aussi retourner vers les océans avec les eaux d'infiltration ou de ruissellement. Enfin, les activités humaines contribuent également à l'émission d'iode (exploitation minière) et en particulier à l'émission de certains isotopes radioactifs (industrie nucléaire, médecine). Certaines émissions importantes anthropogéniques ponctuelles de radio-isotopes (ex : accidents nucléaires) sont ainsi utilisées comme traceurs pour étudier les courants marins ou le cheminement d'eaux souterraines. Dans la croûte terrestre, les quantités de cet élément sont très faibles et 95% de l'iode terrestre est localisé dans les sédiments terrestres provenant de la dégradation des organismes vivants concentrant l'iode [Muramatsu and Hans Wedepohl, 1998]. Ces auteurs proposent aussi que l'iode des sédiments soit recyclé lors de leur dissolution par les eaux hydrothermales.

2 Biochimie de l'halogénéation et de la déhalogénéation

2.1 Généralités sur les métabolites halogénés et leurs rôles physiologiques.

Actuellement plus de 5000 composés halogénés ont été décrits dans la nature [pour revue: Gribble, 2012]. Ils peuvent être synthétisés par des organismes vivants ou bien formés lors de réactions abiotiques spontanées, comme à la surface des océans [Garland, 1981; Spokes and Liss, 1996; Baker, 2005]. Certains composés sont aussi émis naturellement par les volcans [Bobrowski *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005]. Les halogènes les plus couramment rencontrés dans ces molécules sont le brome ou le chlore, tandis que l'iode et le fluor sont plus rares.

Dans les organismes vivants, l'halogénéation est une stratégie efficace pour augmenter l'activité biologique de certains métabolites secondaires. Ces métabolites halogénés peuvent jouer le rôle d'antibiotiques, de molécules signal ou d'hormones et sont très répandus chez certains organismes marins tels que les algues vertes, rouges ou brunes et les bactéries marines [Amachi, 2008; La Barre *et al.*, 2010], mais aussi chez certains invertébrés marins comme les éponges, les mollusques et les vers marins [pour revue: Gribble, 2003, 2012].

Des composés chlorés tel que le chloramphénicol ou la Merochlorine A-D ont une activité antibiotique et sont synthétisés par des bactéries du genre *Streptomyces* [Ehrlich *et al.*, 1947; Kaysser *et al.*, 2012]. D'autres composés bromés (dibromophenol et triiodophenol), synthétisés par certaines algues rouges du genre *Corallina* ou par l'algue verte *Ulvella lens*, ont un effet inhibiteur sur la croissance de l'oursin [Agatsuma *et al.*, 2008]. Les métabolites halogénés ne sont pas spécifiques aux organismes marins avec par exemple le 2,6-chlorophénol qui joue le rôle de phéromone sexuelle chez une tique, *Amblyomma americanum*, présente sur le continent américain [Berger, 1972]. Enfin, les hormones thyroïdiennes (TH) (triiodothyronine (T3) et thyroxine (T4)), jouent un rôle essentiel dans le développement du système nerveux central des mammifères. Des hormones similaires aux TH ont aussi un rôle crucial dans la croissance d'échinodermes, où les hormones T3 et T4 humaines peuvent se substituer à celles présentes chez ces organismes [Chino *et al.*, 1994; Heyland *et al.*, 2004].

Certains COVH isolés d'algues, pourraient agir comme des molécules de défense chimique lors d'interactions biotiques chez les algues. Le tribromométhane (CHBr_3), produit par les algues rouges *C. pilulifera* et *Lithophyllum yessoense*, inhibent la croissance de diatomées épiphytes en surface des algues [Ohsawa *et al.*, 2001]. Chez l'algue rouge *Asparagopsis armata*, le CHBr_3 , l'acide acétique dibromé (Br_2CHCOOH) ainsi que d'autres

composés bromés sont produits en surface du thalle, où ils agissent comme molécules biocides ou repoussantes contre les micro-organismes ou les herbivores [Paul *et al.*, 2006] et empêchent aussi la colonisation par des organismes épiphytes [Ohsawa *et al.*, 2001].

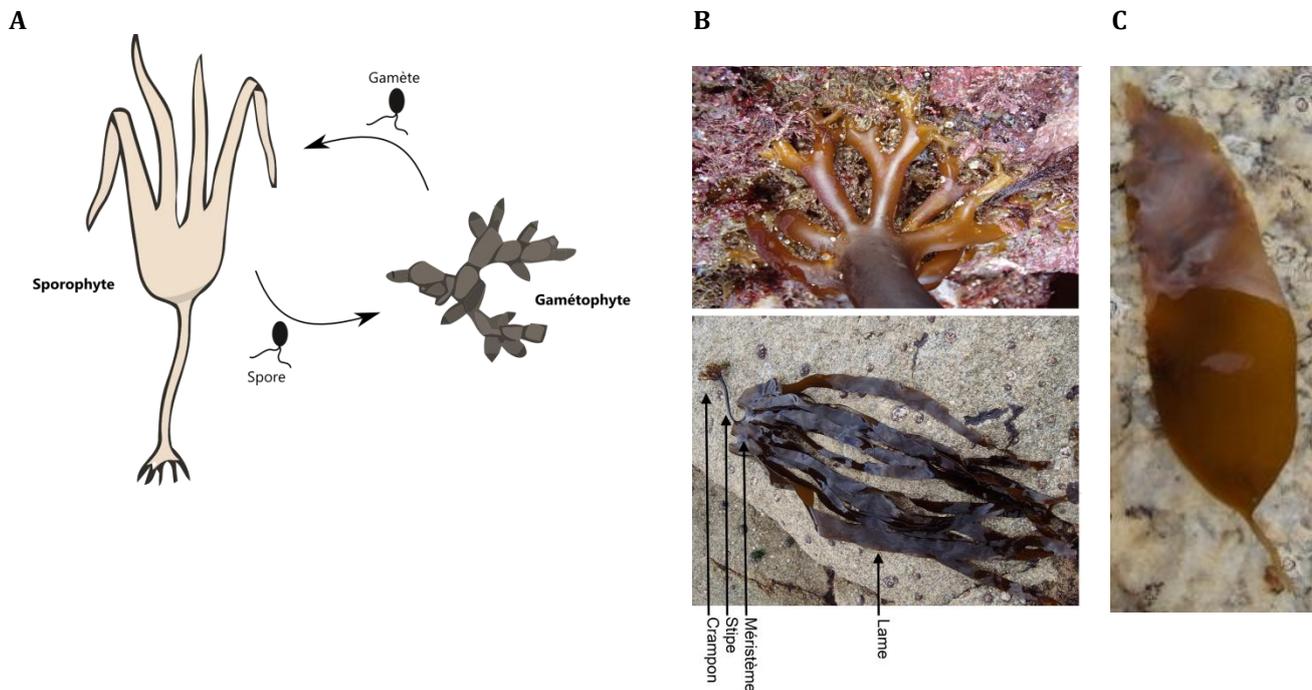
2.2 Métabolismes de l'iode chez l'algue brune *L. digitata* et certaines bactéries marines

2.2.1 *Laminaria digitata*, un organisme modèle pour la concentration de l'iode

Laminaria digitata est une macro-algue faisant partie de la classe des *Phaeophyceae*. Son cycle de vie est de type haplodiplophasique hétéromorphe et est caractérisé par (i) un premier stade gamétophytique où l'algue est microscopique, (ii) un second stade sporophytique, où l'individu macroscopique peut atteindre plusieurs mètres de long (**Figure I.3-A**). *L. digitata* est présente en zone tempérée froide d'Europe du nord et se situe dans la zone de balancement des marées en haut de l'étage infralittoral (étage émergé seulement lors des marées basses de vives eaux).

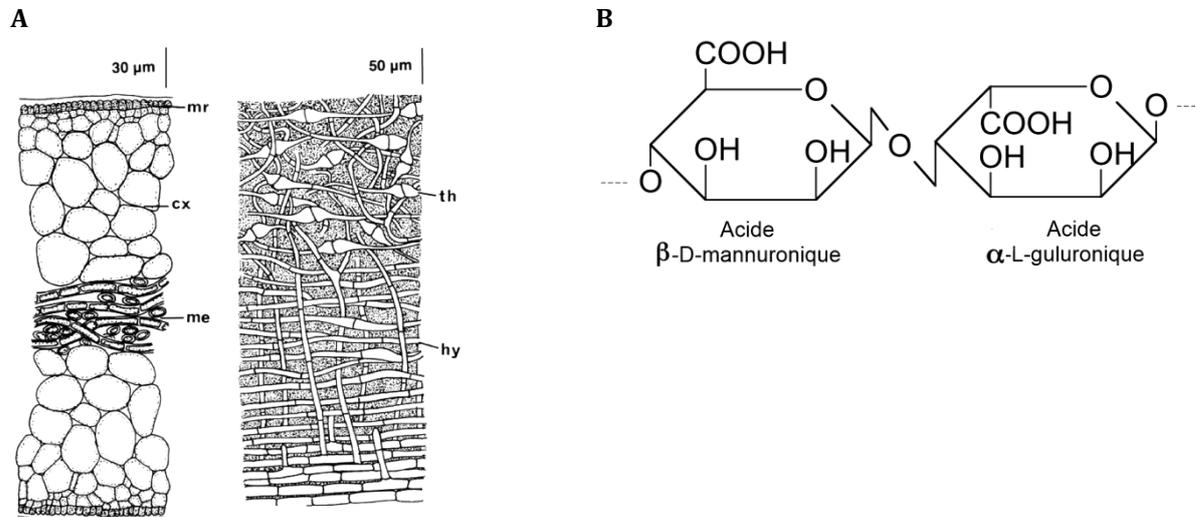
Le thalle de *L. digitata* est composé à sa base d'un crampon permettant sa fixation, d'un stipe souple et d'une lame ou fronde se découpant en lanières (**Figure I.3-B**). Le méristème se situe dans la région stipo-frondale et l'extrémité de la lame correspond aux tissus les plus âgés.

Figure I.3 - Présentation de l'algue *Laminaria digitata*, de son cycle de reproduction (A), de la morphologie d'un thalle de sporophyte adulte (B) et juvénile (C). L'algue est fixée au substrat par un crampon (B -haut) se prolongeant par un long stipe flexible puis par la fronde se séparant en plusieurs lames (B-bas).



La lame et le stipe sont constitués de trois tissus : le méristoderme, le cortex et la medulla (**Figure I.4-A**) [Lee, 2008]. Le méristoderme constitue le tissu le plus externe et il est composé de petites cellules recouvertes d'une épaisse couche de mucilage lui servant de protection. Le cortex est un tissu parenchymateux constitué de grosses cellules. Enfin, la medulla est composée de cellules filamenteuses entourées d'une matrice mucilagineuse. Ces cellules filamenteuses peuvent montrer des éléments en forme de pavillon permettant la connexion entre les cellules. On parle alors d'hyphes à trompette. Des pores sont présents sur les pavillons et permettent le transport des produits de la photosynthèse. Les hyphes sont des types cellulaires provenant d'excroissances de cellules corticales se développant dans la medulla.

Figure I.4 - (A) Section transversale d'une lame de *L. digitata* (gauche) et de la région centrale du stipe (droite) d'après Lee [2008]. (cx) cortex ; (hy) hyphe ; (th) hyphe en trompette ; (me) médulla ; (mr) méristoderme. (B) Représentation des constituants monosaccharidiques de l'alginate.

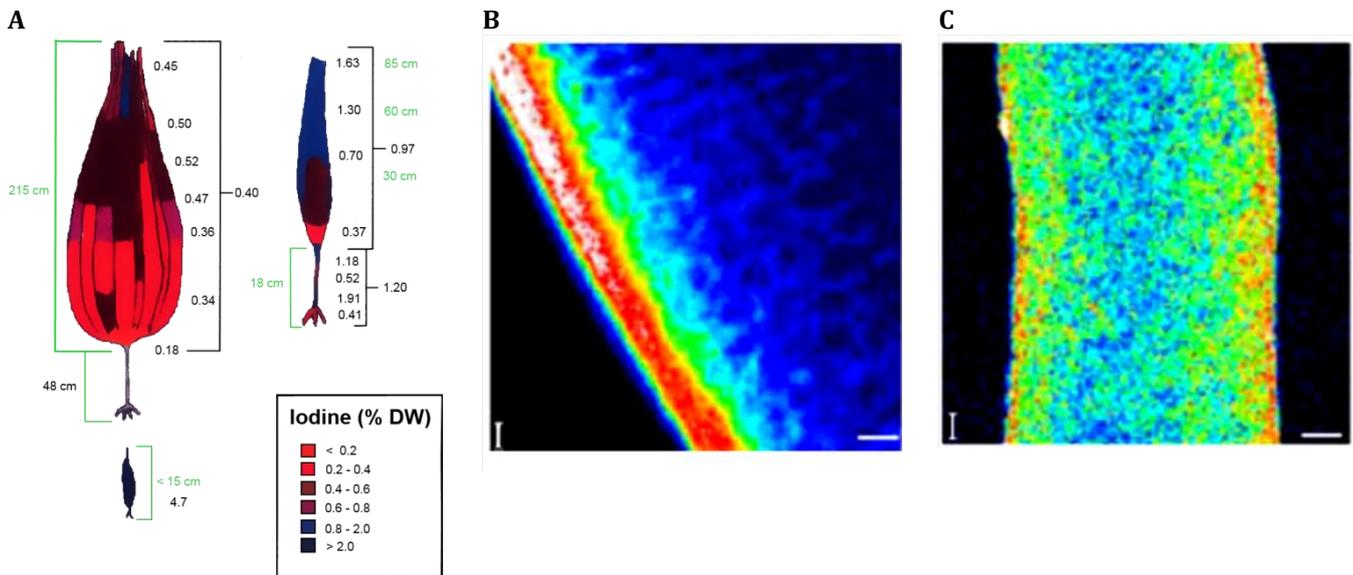


Les parois cellulaires sont constituées de cellulose et d'une matrice mucilagineuse qui est composée principalement d'acides alginiques ou alginates. L'alginate est un polysaccharide composé d'un enchaînement de deux types d'acides uroniques : l'acide β -D-mannuronique (M) et l'acide α -L-guluronique (G) (**Figure I.4-B**). La proportion en blocs GG et MM dans le polymère est responsable des propriétés mécaniques de la matrice mucilagineuse. Les alginates sont aussi présents dans le mucilage externe ainsi que dans les espaces intercellulaires et peuvent représenter jusqu'à 45% de la masse sèche de *L. digitata* [Kloareg and Quatrano, 1988].

L. digitata est connue pour sa capacité à accumuler le plus d'iode parmi les organismes vivants (environ 25 mM) (**Figure I.4-A**) [Küpper et al., 1998]. Chez un sporophyte, l'iode peut représenter de 0,3% du poids sec chez un adulte à 4,5% du poids sec chez une plantule juvénile [Gall et al., 2004], ce qui représente 30 000 à 150 000 fois la concentration de cet élément dans l'eau de mer. La distribution de l'iode chez les sporophytes est hétérogène tout au long de la lame, la teneur augmentant de la région méristématique jusqu'à la partie distale ou jusqu'au crampon. Au niveau tissulaire, l'iode est principalement concentré au niveau du méristoderme (tissu périphérique) et du cortex externe que ce soit dans le stipe ou dans la lame (**Figure I.4-B et C**) [Verhaeghe et al., 2008b]. Au niveau subcellulaire, l'iode est stocké dans l'apoplasme en grande majorité (de 50 à 80 %) sous forme labile, associé aux

polysaccharides des parois [Verhaeghe *et al.*, 2008b] et sous la forme I⁻ [Küpper *et al.*, 2008, 2013].

Figure I.5 – Distribution de l'iode chez les sporophytes de *L. digitata* (A) dans l'ensemble de la plante [Küpper *et al.*, 1998], (B) dans une coupe de stipe (bar d'échelle 25 µm) et (C) dans une coupe de lame (bar d'échelle 50 µm) observée par imagerie multi-élémentaire quantitative d'émission X (PIXE) [Verhaeghe *et al.*, 2008b].

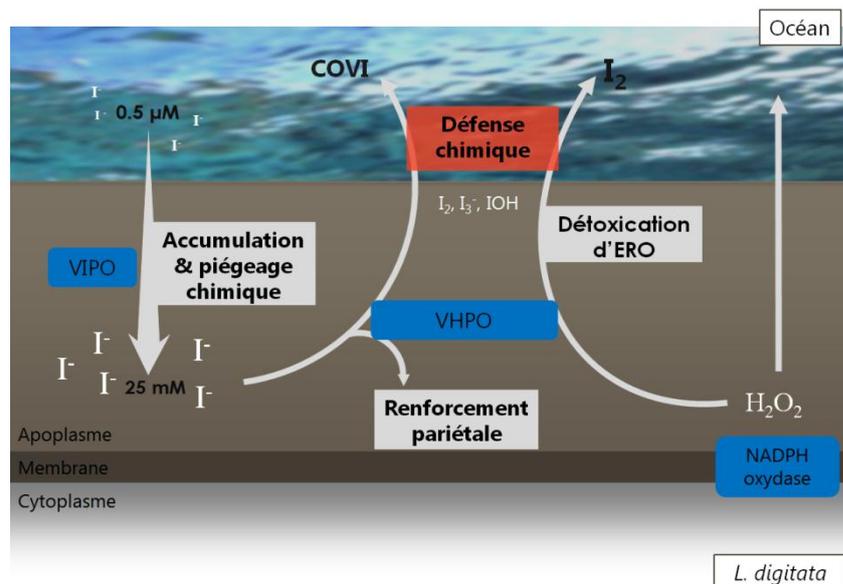


Le rôle exact de l'iode dans le métabolisme des algues est encore mal compris. La principale hypothèse retenue est que I⁻ permettrait de détoxifier les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites lors de stress oxydant [Küpper *et al.*, 2008]. Ces réactions oxydantes sont provoquées par un stress biotique ou abiotique (ex. broutage par un herbivore, exposition à marée basse) [Küpper *et al.*, 2001; Gall *et al.*, 2004]. Les teneurs en iode chez *L. digitata* peuvent varier au cours de l'année. C'est en été que celles-ci sont les plus faibles, lorsque les algues sont le plus exposées aux stress biotiques et abiotiques. En réponse à des stress abiotiques (UV et ozone) en laboratoire, *L. digitata* produit des composés organiques volatils iodés (COVI) et de I₂ [Laternus *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2005; Küpper *et al.*, 2008]. Lors d'une agression biotique, comme dans le cas de l'attaque de bactéries alginolytiques, des éléments de la paroi, les blocs d'oligogulonates (polymère d'acide α-L-gulonique) sont libérés et sont perçus comme des signaux chimiques par l'algue, qui déclenche alors des mécanismes de défense [Küpper *et al.*, 2001, 2002]. En réponse à ces éliciteurs de défense, *L. digitata* produit une forte quantité d'ERO, appelée bouffée oxydante (en anglais : *oxydative burst*), qui est concomitante à un efflux d'iode

[Küpper *et al.*, 2001]. L'action commune d'un emballage oxydatif et d'une forte émission d'iode contribuerait aux mécanismes de défense précoce chez cette algue. La présence massive d'iodures à l'extérieur de la cellule permettrait de détoxifier rapidement le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit lors des bouffées oxydantes. Ce mécanisme de détoxification utiliserait des enzymes, les haloperoxydases à vanadium (VHPO ; cf. **partie I.2.1**) impliquées dans la production de COVI, qui peuvent jouer un rôle dans la défense ou la signalisation chimique [Colin *et al.*, 2005; Küpper *et al.*, 2006]. Les VHPO seraient impliquées dans la remobilisation de l'iode. Enfin, ces enzymes participeraient au pontage des molécules pariétales pour le renforcement de la paroi de l'algue, de façon similaire aux peroxydases de plantes dans la lignification [Bitton *et al.*, 2006; Salgado *et al.*, 2009].

Le modèle de concentration de l'iodure fait aussi appel aux VHPO apoplastiques spécifiques de l'oxydation de l'iode, puisque le bromure et le chlorure sont bien plus abondants dans l'eau de mer (**Figure I.6**) [Küpper *et al.*, 1998; Verhaeghe *et al.*, 2008b]. Enfin, Verhaeghe *et al.* [2008b] proposent que l'iodure labile soit piégé dans un complexe composé de polysaccharides et/ou de polyamides.

Figure I.6 - Mécanisme d'accumulation de l'iode, de détoxification du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et de production de composés impliqués dans la défense chimique. Figure adaptée de Verhaeghe *et al.* [2008b] et Küpper *et al.* [2008].



2.2.2 Bactéries marines, cas de *Zobellia galactanivorans*

Depuis le milieu des années 70, il a été montré que des bactéries étaient capables de catalyser la réaction d'oxydation de l'iodure [Gozlan and Margalith, 1973, 1974]. Des bactéries peuvent ainsi participer au cycle biogéochimique de l'iode [Amachi *et al.*, 2001]. Certaines d'entre elles ont montré la capacité à réduire l'iodate (IO_3^-) en iodure [Councell *et al.*, 1997; Farrenkopf *et al.*, 1997a; Amachi *et al.*, 2007a] et d'autres celle d'oxyder l'iodure en I_2 à l'aide d'oxydase dépendante du cuivre [Amachi *et al.*, 2005b; Suzuki *et al.*, 2012]. Pour les auteurs, ces bactéries pourraient utiliser l'oxydation de l'iodure en présence de oxygène comme source d'énergie de leurs métabolisme [Amachi *et al.*, 2005b]. Cependant dans une études plus récente, les auteurs montrent que la croissance de la souche Mie-8 en milieu minimum et en présence d'iodure n'induit pas la formation d'iode moléculaire qui serait le signe d'une utilisation de l'iodure comme accepteur d'électron [Arakawa *et al.*, 2012]. Enfin il a été rapporté que chez certaines bactéries isolées d'eaux souterraines hypersalines, l'oxydation de l'iodure est catalysée par des enzymes indépendantes du peroxyde d'hydrogène, de la famille des laccases [Suzuki *et al.*, 2012; Seki *et al.*, 2013].

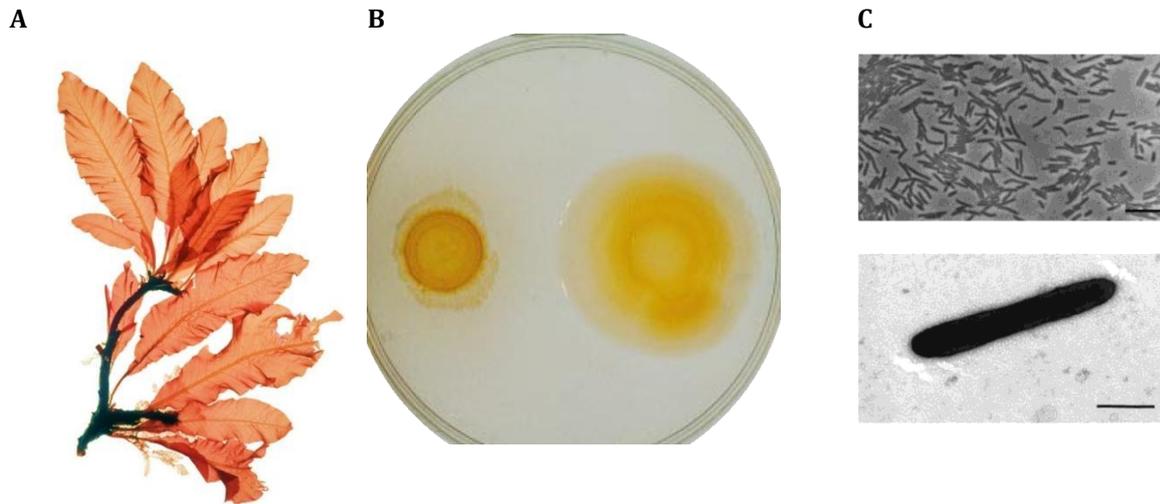
De nombreuses bactéries terrestres et marines ont été isolées pour leurs capacités à concentrer, oxyder ou produire des composés iodés [pour revue: Amachi, 2008]. Certaines ont été caractérisées comme productrices d'iodométhane (CH_3I), de diiodométhane (CH_2I_2) ou chloriodométhane (ClICH_3) [Fuse *et al.*, 2003; Amachi *et al.*, 2005b]. Dans le cas d'*Arenibacter* sp. C21, une flavobactérie marine, le mécanisme de concentration de l'iodure est dépendant du peroxyde d'hydrogène ou de l'oxygène [Amachi *et al.*, 2007b]. En condition d'anaérobie, des interactions entre l'iode et des groupements amines libres présents en surface des bactéries semblent se produire [Amachi *et al.*, 2010]. Toutefois, les processus enzymatiques responsables de l'absorption, du stockage et des transferts d'iode restent à décrypter chez ces microorganismes marins.

Zobellia galactanivorans (souche Dsij¹) est une flavobactérie marine isolée à Roscoff (France) à partir de la surface de l'algue rouge *Delesseria sanguinea* (

Figure I.7) [Potin *et al.*, 1991]. Nommée initialement *Cytophaga drobachiensis*, cette bactérie a été rebaptisée par la suite *Z. galactanivorans* [Barbeyron *et al.*, 2001]. C'est une bactérie Gram-négative en forme de bâtonnets (0,3-0,4 μm de large sur 3,0-8,0 μm de long) (

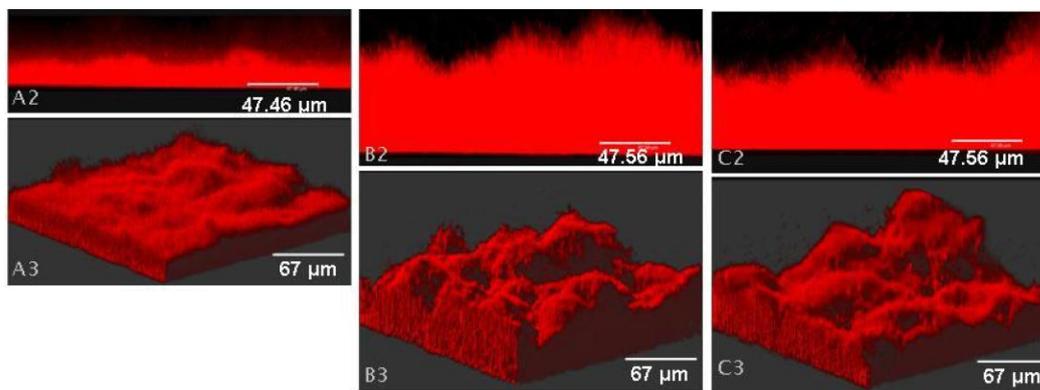
Figure I.7). Sa couleur jaune-orangée est due à la présence de flexirubine, un pigment dont le rôle biologique reste inconnu.

Figure I.7 – La bactérie marine *Z. galactanivorans* a été isolée de l'algue rouge *Delesseria sanguinea* (A) et forme sur gel d'agar des colonies jaune-orangées (B). (C) Photographie par microscopie de contraste de phase d'une culture liquide de cette souche (barre d'échelle 10 μm) en haut ainsi que par microscopie électronique en bas (barre d'échelle 1 μm).



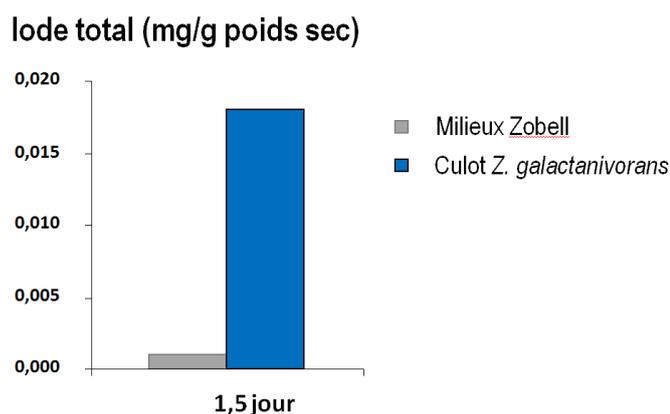
Cette bactérie est étudiée pour ses capacités à dégrader une grande diversité de polysaccharides marins provenant d'algues rouges et brunes. Cette flavobactérie est planctonique mais est capable de former un biofilm en présence d'un support solide. De plus, la présence du composé antimicrobien iodé (CH_2I_2), émis par *L. digitata*, favorise non seulement l'adhérence de *Z. galactanivorans*, mais aussi la croissance de son biofilm (**Figure I.8**) [Salaun, 2009]. Ces résultats indiquent que *Z. galactanivorans* est capable de résister aux métabolites de défense sécrétés par *L. digitata* et plus globalement aux composés iodés.

Figure I.8 – Visualisation en 3D du biofilm de *Z. galactanivorans* en présence d'exsudats de *L. digitata*. Biofilm témoin formé en milieu de culture ZoBell (A), puis enrichi en exsudats de *L. digitata* non élicitée (B) ou élicitée (C). (2) Empilement des coupes transversales ; (3) visualisation du biofilm 3D. Les bactéries sont colorées au Syto 61 Red (marqueur d'acide nucléique) avant leur observation au microscope confocal à balayage laser. Images provenant de la thèse de Salaün [2009].



Le génome de *Z. galactanivorans* de 5.5 Mb a entièrement été séquencé et 4738 gènes ont été prédits [Barbeyron et al., en préparation]. Au cours de l'annotation experte de son génome faite au laboratoire de Roscoff, trois gènes homologues de VHPO ont été identifiés parmi les gènes prédits. L'expression hétérologue de l'un d'entre eux a permis de caractériser biochimiquement la première VHPO spécifique de l'oxydation de l'iodure chez une bactérie marine et sa structure tridimensionnelle a été résolue au laboratoire de Roscoff [Thèse E. Rebuffet, équipe de M. Czjzek ; Delage et al., in preparation]. Le génome de *Z. galactanivorans* a aussi révélé des gènes présentant des similarités importantes avec ceux codant pour le symporteur Na/I des mammifères ou pour la iodotyrosine déiodinase humaine. Des études préliminaires menées dans le laboratoire ont montré que *Z. galactanivorans* était capable de concentrer l'iode d'un facteur cinq par rapport à celle de l'eau de mer (**Figure I.9**). Ces premiers résultats semblent indiquer que *Z. galactanivorans* possède un métabolisme actif de l'iode dont le rôle biologique reste encore à caractériser et à comprendre. Celui-ci pourrait permettre la détoxification de composés halogénés bactéricides produits par les algues lors de leurs réponses de défenses. En parallèle, plusieurs gènes codent pour des enzymes détoxiquant les ERO (2 catalases, 2 superoxyde dismutases à Mn ou à [Cu-Zn], 1 peroxyrédoxine, 3 peroxydases à cytochrome c) et pouvant permettre la détoxification des ERO émis par les algues lors de leurs lyses.

Figure I.9 – Accumulation d'iode chez *Z. galactanivorans* (résultats non-publiés).



2.3 Propriété de la liaison halogène

L'utilisation des halogènes dans des voies de biosynthèse nécessite l'implication d'enzymes capables soit d'intégrer des halogènes à un composé organique soit de cliver les liaisons halogène-carbone. L'incorporation de l'iode dans les molécules organiques nécessite la réduction d' IO_3^- ou l'oxydation d' I^- , afin de produire une forme électrophile de l'iode permettant la création de liaison C-I ou N-I.

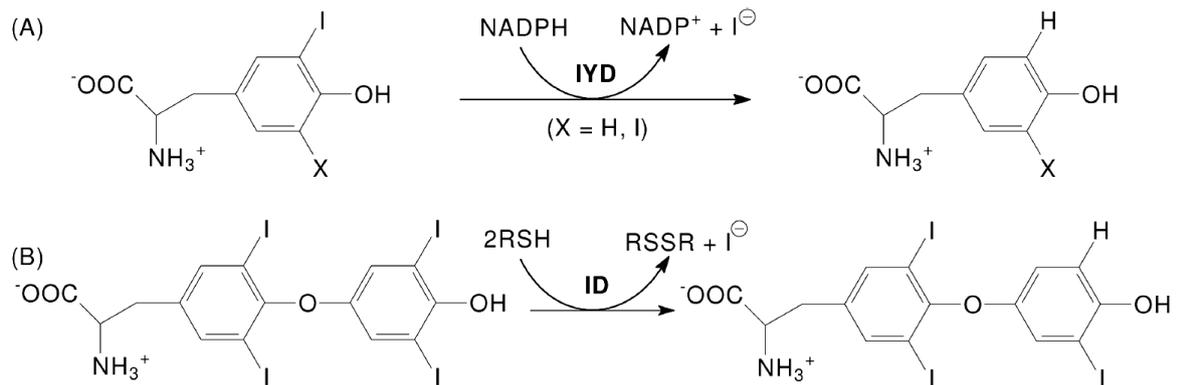
L'ajout d'halogénures dans les molécules organiques augmente l'activité biologique de ces composés. L'halogénure forme ensuite une liaison ayant des caractéristiques proches des liaisons hydrogènes, à l'exception du fluor qui présente une trop forte électronégativité [pour revue: [Metrangolo et al., 2005](#); [Wilcken et al., 2013](#)]. Dans la liaison halogène R-X...Y-R', l'halogène X joue le rôle d'acide de Lewis et Y celle d'une base de Lewis et donneur d'électron. La taille de ces liaisons est égale ou inférieure à la somme des rayons de van der Waals des atomes impliqués tandis que pour une liaison hydrogène celle-ci est supérieure à cette somme (~2,5 Å). L'énergie de la liaison halogène est très variable et dépend en grande partie de la molécule à laquelle est lié l'halogène.

2.4 Enzymes de la déhalogénéation : exemple des déiodinases

La déhalogénéation est une stratégie mise en place pour se défendre contre les composés halogénés biocides chez certaines bactéries ou encore pour recycler l'iode au niveau de la glande thyroïdienne chez les mammifères. Plusieurs familles d'enzymes sont impliquées dans ces réactions et il existe jusqu'à huit mécanismes enzymatiques différents,

identifiés chez les bactéries, conduisant à la déhalogénéation de composés organiques [pour revues: Fetzner, 1998; van Pée and Unversucht, 2003]. Dans cette partie nous allons nous intéresser à deux déiodinases de mammifères présentes dans la glande thyroïdienne. Ces deux enzymes utilisent des stratégies différentes pour catalyser la déiodation (**Figure I.10**).

Figure I.10 - Déiodation catalysée par l'iodotyrosine déiodinase (IYD) (A) et par l'iodothyronine déiodinase (ID) (B).



Les iodothyronine déiodinases (ID ; EC 1.97.1.10 et 1.97.1.11) déhalogènent la thyroxine (ou T4) sur le cycle extérieur pour désactiver cette hormone, ou sur le cycle central pour synthétiser l'hormone triiodothyronine (T3) (**Figure I.10-B**) [pour revue: Bianco and Kim, 2006; Gereben *et al.*, 2008]. Il existe trois types d'ID, chacune ayant un rôle biologique différent dans la synthèse ou la catalyse des hormones thyroïdiennes. Ces enzymes utilisent une sélénocystéine présente dans le site actif pour catalyser la réaction de déhalogénéation de la thyroxine [Berry *et al.*, 1991].

L'iodotyrosine déiodinase (IYD ; EC 1.22.1.1) fait partie de la superfamille des NADH oxydase/Flavine réductases et possède un ancrage à la membrane [Friedman *et al.*, 2006]. A la différence des enzymes de cette superfamille, les cystéines conservées dans le site actif ne sont pas strictement nécessaires à l'activité de l'enzyme [Watson *et al.*, 2008]. Ces enzymes ont été caractérisées chez les mammifères et permettent le recyclage de l'iode dans la thyroïde à partir des mono- et di-iodotyrosines (MIT et DIT) qui sont des sous-produits de la synthèse des hormones T3 et T4. La IYD possède de la DIT et de la MIT en présence d'un agent réducteur, soit la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH), soit la nicotinamide

adénine dinucléotide phosphate (NADPH). La séquence correspondant à la région soluble de IYD de *Mus musculus* a été clonée et surexprimé chez *Escherichia coli*. sa structure tridimensionnelle a été obtenue en présence ou nom de ses cofacteurs et substrats [Thomas *et al.*, 2009; Buss *et al.*, 2012].

2.5 Introduction aux enzymes de l'halogénéation

Dans la nature plusieurs familles d'enzymes ont été caractérisées pour leur capacité à oxyder les halogénures. Actuellement quatre groupes d'enzymes impliquées dans l'halogénéation ont été décrits et classés selon la nature de leurs cofacteurs (**Figure I.11**) et utilisent des mécanismes catalytiques bien distincts [pour revue: Vaillancourt *et al.*, 2006; Butler and Sandy, 2009].

Le premier groupe rassemble les enzymes qui ont une flavine adénine dinucléotide (FADH₂) comme cofacteur, telle que l'halogénase chloramphénicol CmlS isolée de *Streptomyces venezuelae* impliquée dans la voie de biosynthèse du chloramphénicol [Podzelinska *et al.*, 2010]. Ces halogénases FADH₂-dépendantes ont été isolées de plusieurs bactéries et présentent une molécule de FADH₂ dans leur site actif. Durant le cycle catalytique, le cofacteur réagit avec une molécule d'oxygène, conduisant à la formation d'une liaison enzyme-flavine. Un ion chlorure peut attaquer cette flavine hydroperoxydase entraînant la formation d'acide hypochloreux qui pourra spontanément chlorer une molécule organique.

Figure I.11 – Centre rédox présent dans différents sites actifs des (A) haloperoxydases à hème ou (B) dépendant du vanadium et (C) d’halogénases dépendantes du FADH₂ ou (D) dépendantes du Fe non-héminique.

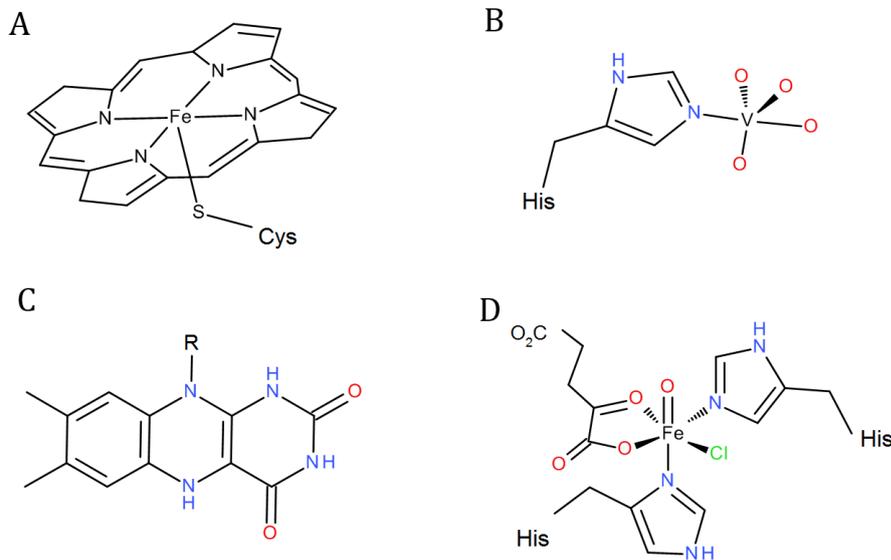
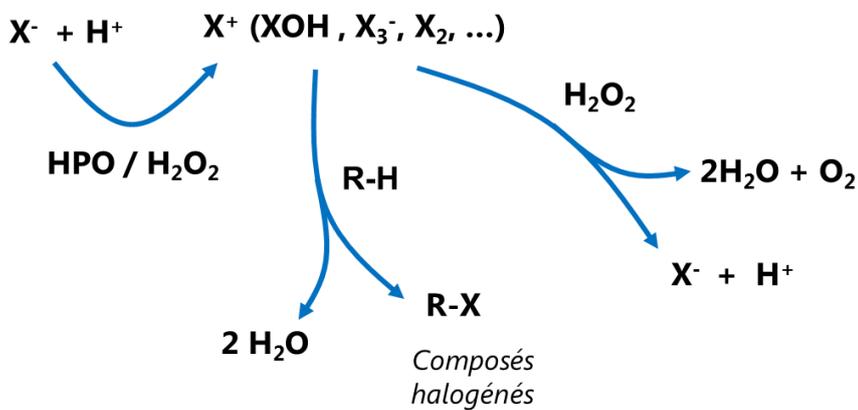


Figure I.12 – Réactions enzymatiques des haloperoxydases. Les halogénures (X : Cl, Br et I) sont oxydés en présence de peroxyde d’hydrogène et peuvent ensuite réagir avec des composés organiques (R-H) ou une seconde molécule d’H₂O₂.



Le second groupe est composé d’halogénases dépendantes du Fe non-héminique. La première enzyme fut caractérisée chez *Pseudomonas syringae* et est impliquée dans la voie de biosynthèse de la syringomycine E, une molécule phytotoxique [Vaillancourt *et al.*, 2005]. Ces enzymes montrent des homologies de séquence avec les oxygénases dépendantes du fer non-héminique et sont capables de catalyser uniquement la chloration ou la bromation de

composés organiques. Ces enzymes sont aussi dépendantes de l' α -kétoglutarate et du dioxygène [Vaillancourt *et al.*, 2005].

Le troisième groupe rassemble les haloperoxydase (HPO) à hème. Historiquement la première enzyme impliquée dans un mécanisme d'halogénéation fut détectée chez l'ascomycète terrestre *Leptoxyphium fumago* (anciennement *Caldariomyces fumago*) puis caractérisée comme étant une chloropéroxydase à hème. L'un des produits de cette enzyme est un composé chloré antimicrobien, la caldariomycine [Hager *et al.*, 1966]. La découverte de cette molécule fut à l'origine du test spectrophotométrique utilisant le monochlorodimédone pour détecter les activités haloperoxydase. Chez les halopéroxydases hème-dépendantes, l'atome de fer joue le rôle d'agent redox. Durant le cycle catalytique, le peroxyde d'hydrogène oxyde l'atome de Fe(III) en Fe(IV) et cette réaction crée une double liaison Fe(IV)=O. Cet intermédiaire peut ensuite oxyder un anion Cl^- pour former une molécule de OCl^- , qui peut ensuite réagir avec une molécule organique ou avec une seconde molécule d' H_2O_2 .

Enfin le dernier groupe réunit les halopéroxydases dépendantes du vanadium (cf. **insert 2**) et est décrit plus longuement dans le paragraphe suivant. Les halopéroxydases dépendantes du vanadium (VHPO), tout comme les HPO à hème, catalysent l'oxydation des halogénures (X^- : Cl^- , Br^- , I^-) en présence de peroxyde d'hydrogène et produisent l'acide hypohalogéneux correspondant (XOH) ou un intermédiaire halogéné du type OX^- , X_3^- or X_2 (**Figure I.12**). Ces intermédiaires diffusibles sont très réactifs et peuvent halogéner une large variété de composés nucléophiles [pour revue: Carter-Franklin and Butler, 2004; Butler and Sandy, 2009; Wischang and Hartung, 2011]. En absence de substrats organiques, une seconde molécule d' H_2O_2 peut être oxydée pour former du dioxygène et un anion X^- . Les VHPO sont nommées en fonction de l'halogène le plus électronégatif qu'elles peuvent oxyder. Les chloroperoxydases (VCPO) peuvent oxyder le chlorure, le bromure et l'iodure ; les bromoperoxydases (VBPO) peuvent quant à elles réagir avec le bromure et l'iodure ; enfin les iodoperoxydases (VIPO) sont spécifiques de l'oxydation de l'iodure.

Insert 2

Du Panchromium au Vanadium



Gravure représentant la Déesse Freyja conduisant son char tiré par des chats (d'Alexander 1874), Cristal de vanadinite sur baryte de la mine de Mibladene, Maroc.

La découverte du Vanadium eut lieu deux fois au cours de l'histoire. La première fois date de 1801, lorsque Andrés Manuel del Río (minéralogiste espagnol) traita de la vanadinite ($Pb_5(VO_4)_3Cl$) par l'acide sulfurique et isola un nouvel élément. Il le nomma tout d'abord Panchromium (du grec, *panchromo* signifiant « toutes les couleurs ») dans un premier article publié dans un journal espagnol en 1803 [de la Quadra, 1803]. Il envoya l'article décrivant ses travaux au chimiste français Jean-Antoine Chaptal. Malheureusement l'article fut perdu lors du naufrage du bateau le transportant au large du Brésil. del Río renomma par la suite cet élément Erythronium du fait de sa couleur rouge lorsqu'il est chauffé en milieu acide. Mais lorsque del Río lut les résultats du chimiste français Fourcroy sur la découverte du chrome, il pensa que ses conclusions étaient erronées. Le chimiste français Collet-Descotils [1805], après avoir analysé un échantillon de vanadinite, conclura d'ailleurs que l'élément isolé par del Río était bien du chrome.

Trente ans plus tard, en 1830, le chimiste suédois Nils Sefström découvrit le vanadium à partir de minéraux extraits d'une mine de fer et nomma cet élément Vanadium, dérivé de Vanadis (surnom de Freyja, déesse suédoise de la beauté et de la jeunesse). Par la suite le chimiste allemand, Friedrich Wöhler découvrant les résultats de del Río, réhabilita ce dernier comme la première personne ayant découvert cet élément mais le nom resta Vanadium.

Le vanadium est utilisé principalement dans les alliages depuis le début du XX^{ème} siècle et est un sous-produit de l'extraction du fer, du cuivre, du plomb,... Il sert aussi en tant que catalyseur et entre dans la composition de pigments [pour revue : Crans *et al.*, 2004].

3 Les haloperoxydases à vanadium de la structure à l'exploration de leurs mécanismes catalytiques

3.1 Caractérisation biochimique des VHPO

3.1.1 Répartition des VHPO chez les organismes marins

La première VHPO caractérisée fut isolée chez l'algue brune *Ascophyllum nodosum* [Vilter, 1983a, 1984; Wever *et al.*, 1985]. Par la suite, cette enzyme (An-VBPO1) a été utilisée comme modèle pour comprendre les mécanismes catalytiques des VHPO (cf. **chapitre I.3**). Depuis, de nombreuses activités VHPO ont été détectées dans un très grand nombre de macroalgues, en particulier chez les Phaeophyceae [pour revue: Vilter, 1995]. Cependant peu de données ont pu être obtenues sur leurs propriétés biochimiques à cause de la difficulté à purifier ces enzymes à partir d'extraits d'algues riches en composés polyphénoliques et en polysaccharides. La mise en place d'un protocole spécifique a cependant permis l'acquisition de données biochimiques à partir d'enzymes purifiées ou partiellement purifiées de laminaires ou de fucales (**Tableau I.3**) [Jordan and Vilter, 1991; Vilter, 1994]. Chez l'algue brune *A. nodosum*, une seconde isoforme de VBPO a été récemment caractérisée (An-VBPO2) [Wischang *et al.*, 2012]. Ces deux enzymes, An-VBPO1 et 2, sont respectivement localisées à l'intérieur et en surface du thalle [Krenn *et al.*, 1988, 1989; Tromp *et al.*, 1990]. Chez *Laminaria digitata* deux isoformes de VHPO ont aussi été isolées mais celles-ci ont des spécificités distinctes. La première a été caractérisée comme VBPO (Ld-VBPO), tandis que la seconde est spécifique de l'oxydation de l'iode (Ld-VIPO) [Colin *et al.*, 2003]. Si des activités VIPO ont déjà été identifiées chez d'autres espèces de *Laminaria* [Almeida *et al.*, 2001], c'est la seule VIPO clonée jusqu'à présent chez les algues [Colin *et al.*, 2005].

Chez les algues rouges, les VBPO les plus étudiées ont été isolées de *Corallina officinalis* (Co-VBPO) et *Corallina pilulifera* (Cp-VBPO) [Yamada *et al.*, 1985; Itoh *et al.*, 1986]. Plus récemment trois nouvelles VBPO ont été caractérisées chez *Delisea pulchra*, *Plocanium cartilagineum* et chez *Gracilaria changii* (Gc-VBPO) [Sandy *et al.*, 2011; Baharum *et al.*, 2013].

Plusieurs VHPO ont aussi été caractérisées au niveau biochimique et moléculaire à partir de bactéries ou de champignons [pour revue: Littlechild *et al.*, 2009; Winter and Moore, 2009; Butler and Sandy, 2009]. L'une des VHPO les plus étudiées est une VCPO isolée du

champignon *Curvularia inaequalis* (Ci-VCPO) [Simons *et al.*, 1995]. Une VBPO a été identifiée chez le lichen *Xanthoria parietina* [Plat *et al.*, 1987; Wever *et al.*, 1988]. Enfin, plus récemment une VBPO a été caractérisée biochimiquement chez une cyanobactérie *Synechococcus* [Johnson *et al.*, 2011] et une VCPO chez une actinobactérie *Streptomyces* [Winter *et al.*, 2007; Bernhardt *et al.*, 2011].

Tableau I.3 – Haloperoxydases à vanadium caractérisées au niveau moléculaire et structurel.

Espèces	Activité	Code GenBank	Structure	Mutants	
Algues brunes	<i>Ascophyllum nodosum</i>	VBPO1	P81701 ^a	1QI9 ^b	-
		VBPO2	CCD42013	-	-
	<i>Fucus distichus</i>	VBPO	AAC35279	-	-
		VBPO	CAD37191.1	-	-
	<i>Laminaria digitata</i>	VIPO	CAF04025	-	-
Algues rouges	<i>Corallina officinalis</i>	VBPO	1QHBA-F ^a AAM46061	1QHB ^b	-
			1UP8_A	1UP8 ^c	H478A ^d R397X ^d
	<i>Corallina pilulifera</i>	VBPO1	BAA31261	-	-
		VBPO2	BAA31262	-	-
	<i>Gracilaria changii</i>	VBPO	AGE00855	-	R379F, H ^d
Ascomycètes	<i>Curvularia inaequalis</i>	VCPO	CAA59686	1VNC ^b	K353A, R360A, P395T, D, E, S402A, H404A, R490A ^d
	<i>Embellisia didymospora</i>	VCPO	CAA72622	-	-
Eubacteries	<i>Synechococcus</i> sp. WH 8020	VBPO	ADO20318	-	-
	<i>Streptomyces</i> sp. CNQ- 525	VCPO	ABS50486.1	-	-

VBPO: bromoperoxydase à vanadium; VIPO: iodoperoxydase à vanadium; VCPO: chloroperoxydase à vanadium; X: Tous les acides aminés sauf R; ^a obtenue par séquençage de la protéine; ^b Structure résolue à partir de la forme native et ^c de l'enzyme recombinante; ^d numérotation des résidus en accord avec les ADNc traduits.

3.1.2 Tests enzymatiques et propriétés biochimiques

Les VHPO ne catalysent pas directement l'halogénéation de composés organiques mais produisent une large variété de produits transitoire du noté X^+ correspondant à HOX, X_3^- ou X_2 qui varient en fonction des paramètres physico-chimiques (pH, type de tampon,...). Aussi plusieurs tests ont été développés pour analyser l'activité VHPO en utilisant des molécules ou des sondes chimiques facilement « halogénables ». Le premier test spectrophotométrique développé est fondé sur l'halogénéation du rouge de phénol et est utilisé pour étudier l'activité VBPO et VCPO [de Boer *et al.*, 1987]. Cependant ce test ne peut pas être appliqué pour une étude cinétique classique à cause d'un manque de stœchiométrie. Une méthode de détection basée sur l'halogénéation de l'*o*-dianisidine reste quant à elle limitée à une caractérisation qualitative de l'activité VHPO sur gel natif [Jordan and Vilter, 1991].

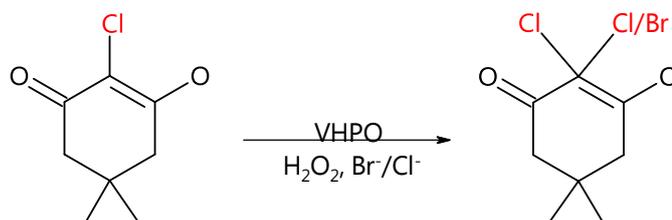
Actuellement le substrat le plus utilisé pour étudier la chloration ou la bromation est la monochlorodimédone (MCD ; **Figure I.13**) [Hager *et al.*, 1966]. La réaction d'halogénéation est suivie par spectrophotométrie à 290 nm grâce à la diminution de l'absorbance de la MCD ($\epsilon_{MCD, 290nm} = 20\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{\text{halo-MCD}, 290nm} = 100\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). L'halogénéation de la MCD est quantitative seulement à des pH inférieurs à 6,5; l'analyse de l'activité VBPO et VCPO est donc limitée à des milieux acides. En outre, le test permet de suivre uniquement la disparition du substrat, et il pourrait conduire à la détection de fausses activités VHPO [Wagner *et al.*, 2008]. Ce test reste néanmoins très utilisé pour déterminer les paramètres cinétiques des VHPO qui sont rassemblés dans le

Un nouveau test fondé sur l'halogénéation du bleu de thymol (TB ; **Figure I.13**) a été développé afin de pouvoir suivre à la fois l'activité VBPO et VIPO. Cette méthode mesure l'augmentation de l'absorbance à 620 nm, due à la dihalogénéation du TB ($\epsilon_{TB, 620nm} = 2,500\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{TB12, 620nm} = 40,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ and $\epsilon_{TBBr2, 620nm} = 37,200\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) [Verhaeghe *et al.*, 2008a]. L'une des limites importante de cette méthode est qu'elle n'est applicable qu'entre pH 7 et 8.

Il est à noter que le pH optimal pour l'activité des différentes VHPO est compris entre pH 4,5 et 6,5 (**Tableau I.4**) [Wever *et al.*, 1985; Sheffield *et al.*, 1992; Carter *et al.*, 2002]. Néanmoins les deux méthodes étant sensibles aux variations de pH, la détermination du pH optimal reste discutable [Leblanc *et al.*, 2006].

Figure I.13 – Représentation schématique de l'halogénéation (A) de la monochlorodimédone et (B) du bleu de thymol, catalysée par les haloperoxydases à vanadium.

A



B

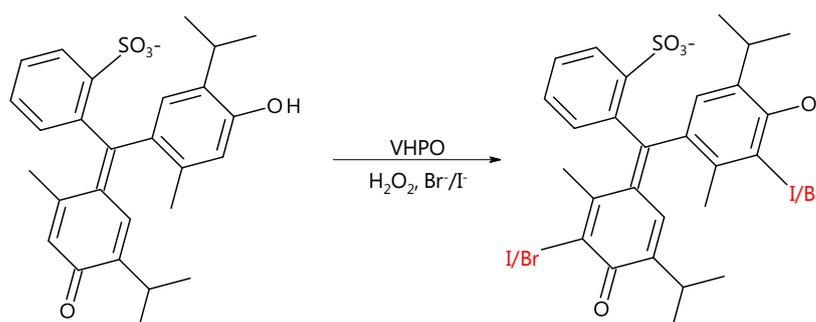


Tableau I.4 – Paramètres cinétiques des VHPO caractérisées au niveau moléculaire. Valeurs des paramètres cinétiques aux pH et températures indiqués.

Enzymes	pH	Temp (°C)	k_{cat} (s ⁻¹)			K_m				K_i
			Cl ⁻	Br ⁻	I ⁻	Cl ⁻ (mM)	Br ⁻ (mM)	(mM)	H ₂ O ₂ (μM)	
An-VBPOI ^{a,b}	5,9	22	85 ¹	75 ²		3,7 ± 0,3 ¹	0,18 ²		55,0 ± 0,6 ¹	255 ¹
An-VBPOII ^c	5,9	22	153 ¹			0,32 ± 0,1 ¹			22,5 ± 3,6 ¹	125 ¹
Ld-VBPO ^d	6,2	20	75 ¹	38 ³		0,5 ¹	18,1 ³			
Ld-VIPO ^d	6,1	20		462 ³			2,5 ³			
Cp-VBPO ^e	6						11		92	
Co-VBPO ^f	6,4	25					1 ¹		60 ¹	
Gc-VBPOI ^g	7						4,69 ¹	0,08 ²	0,71 ¹	
Ci-VCPO ^{h,i}	6,3		7,3 ¹	37 ¹		10 ¹	7.10 ⁻³ ¹		2,6 ¹	

^a Wischang and Hartung, 2011; ^b Verhaeghe et al., 2008a, ^c Wischang et al., 2012; ^d Colin et al., 2005; ^e Itoh et al., 1986; ^f Sheffield et al., 1992; ^g Baharum et al., 2013, ^h Hemrika et al., 1999, ⁱ Tanaka et al., 2003. Paramètres cinétiques obtenus par (1) Monochlorodimédone, (2) Bleu de thymol (à pH 8) et (3) triiodide.

3.1.3 Fonctions biochimiques et biologiques des VHPO

Actuellement le(s) rôle(s) biologique(s) des VHPO reste(nt) souvent corrélé(s) aux études physiologiques et à l'analyse de l'action des COVH produits par les organismes vivants. Néanmoins, le rôle des VHPO comme enzymes de détoxification lors d'un stress est

confirmé par les résultats obtenus chez les deux algues rouges *C. officinalis* et *G. changii*. En effet, il a été montré une augmentation de l'expression de VBPO en réponse à un stress abiotique [Latham, 2008; Baharum *et al.*, 2013].

La purification de VHPO natives ou recombinantes a permis d'analyser *in vitro* certains produits issus de l'activité de ces enzymes et ainsi de mieux comprendre leurs rôles. L'An-VBPO2 est capable de biosynthétiser *in vitro* le méthyl-4-bromopyrrole-2-carboxylate, un produit naturel isolé d'éponges marines [Wischang *et al.*, 2012]. Les VBPO des algues brunes catalysent *in vitro* des liaisons entre les phlorotannins qui sont des composés impliqués dans les réponses au stress abiotique et biotique tels que la défense contre les UV ou les herbivores [Berglin *et al.*, 2004]. Plus récemment, il a été montré que la condensation des phlorotannins avec les alginates pouvait être catalysée par des VBPO d'algues rouges commerciales [Salgado *et al.*, 2009]. Les VBPO natives purifiées de l'algue rouge *Corallina officinalis* sont capables de synthétiser différents composés bromés. Par exemple, ces enzymes catalysent le couplage oxydatif de dibenzo-p-dioxines polybromées (PBDD), qui constituent dans l'environnement un polluant bromé du type dioxine [Arnoldsson *et al.*, 2012]. La biosynthèse de sesquiterpènes cycliques bromés fut pour la première fois établie *in vitro* avec la VBPO isolée à partir des algues rouges marines appartenant aux espèces *Plocamium* et *Corallina* [Carter-Franklin *et al.*, 2003]. Enfin, la VBPO de *Delisea pulchra* produit des bromofuranones, molécules connues pour interférer avec le *quorum-sensing*, mécanisme de communication chimique impliqué dans la croissance des biofilms bactériens [Sandy *et al.*, 2011]. D'autres études faites chez *Delisea pulchra* ont montré l'importance de ce type de composés dans la communication entre individus et dans le contrôle du biofilm [pour revue: Harder *et al.*, 2012].

Chez les macroalgues, la concentration en vanadium varie au cours des saisons [Hartung *et al.*, 2008]. Des variations saisonnières de l'activité VHPO et selon les tissus ont aussi été rapportées chez différentes algues brunes (ex : *Pelvetia canaliculata*, *L. digitata*, *A. nodosum*) [de Boer *et al.*, 1986; Krenn *et al.*, 1989; Almeida *et al.*, 2000; Gall *et al.*, 2004; Hartung *et al.*, 2008] ou algues rouges (ex : *C. pilulifera*) [Itoh and Shinya, 1994; Itoh *et al.*, 1996] suggérant un rôle des VHPO dans la croissance et la physiologie de ces algues.

Les seules études fonctionnelles sur le rôle biologique des VHPO ont été réalisées chez les bactéries. Par exemple, l'activité bromoperoxydase fut d'abord détectée chez les

Actinomycètes produisant le chloramphénicol [van Pée and Lingens, 1984]. Chez une bactérie de la famille des Streptomycètes, une nouvelle VCPO, codée par le gène *napH1*, catalyse une réaction de chloration cyclisation stéréosélective lors de la biosynthèse d'un antibiotique, la napyradiomycine, [Winter et al., 2007; Bernhardt et al., 2011]. Plus récemment, des expérimentations de biosynthèse *in vivo* ont démontré, chez *Streptomyces*, le rôle de ces enzymes dans la biosynthèse d'un nouvel antibiotique chloré, la merochlorine [Kaysser et al., 2012].

Le champignon *Curvularia inaequalis* est capable, grâce à la présence d'enzymes VCPO, de chlorer des cycles aromatiques de la lignine [Ortiz-Bermúdez, 2003; Ortiz-Bermúdez et al., 2007]. Pour les auteurs cette chloration permettrait la décomposition du bois.

3.2.4 Applications biotechnologiques des VHPOs

Les haloperoxydases présentent une grande thermostabilité ainsi qu'une résistance à de fortes concentrations de solvants organiques, tels que le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'acétone et le dioxane ou encore, tels que l'hypochlorure de guanidine ou le laurylsulfate de sodium (SDS) [de Boer et al., 1987; Tromp et al., 1990].

Grâce à leurs propriétés, les VHPO sont de bons candidats aux applications biotechnologiques [Smith et al., 2013]. De nombreux groupes de recherche étudient leurs fonctions biochimiques en utilisant des systèmes *in vitro* afin de relier l'activité biochimique des VHPO à la biosynthèse de produits halogénés et aussi afin de caractériser leurs structures chimiques [Winter and Moore, 2009]. Ces enzymes peuvent en effet halogéner des molécules organiques ayant des intérêts économiques, comme des antibiotiques (ex : napyradiomycine, chloramphenicol, merochlorine) [van Pée and Lingens, 1984; Winter et al., 2007; Bernhardt et al., 2011; Kaysser et al., 2012]. Dans certains cas cette biosynthèse présente une forte stéréosélectivité [Winter et al., 2007; Bernhardt et al., 2011]. Un exemple de cet intérêt biotechnologique est la conversion, par un extrait enzymatique de *Curvularia protuberata*, de l'indène (hydrocarbure bicyclique) en 2S,1S-bromoindanol et oxyde 1S,2R-indène, précurseur dans la synthèse d'un inhibiteur de protéase commercialisé par Merck (Crixivan®) [Zhang et al., 1999].

3.2 Caractérisation structurale des VHPO

3.2.1 Comparaison des structures primaires

Au cours de ces trente dernières années, très peu d'haloperoxydases à vanadium ont été clonées et caractérisées au niveau protéique (**Tableau I.3**). Malgré une activité enzymatique commune, les VHPO partagent de très faibles identités de séquences protéiques qui sont seulement comprises entre 30 et 40% entre les VHPO d'algues rouges et brunes par exemple. L'isoforme 1 de la VBPO de *A. nodosum* (An-VBPO1) [Vilter, 1995] et celle de l'algue brune *Fucus distichus* (Fd-VBPO) [Vreeland *et al.*, 1998] partagent 86% d'identité de séquence protéique, tandis que la seconde isoforme d'*A. nodosum* (An-VBPO2) ne présente respectivement que 43% et 42% d'identité de séquence avec An-VBPO1 et Fd-VBPO [Wischang *et al.*, 2012]. Néanmoins l'An-VBPO2 présente 61% d'identités en acides aminés avec la VBPO de *L. digitata*. Les trois VBPO isolées des algues rouges *C. officinalis* et *C. pilulifera* partagent quant à elles plus de 90% d'identité [Shimonishi *et al.*, 1998; Carter *et al.*, 2002]. Les VCPO isolés de deux ascomycètes, *C. inaequalis* [Simons *et al.*, 1995] et *Embellisia didymospora* [Barnett *et al.*, 1998], présentent une identité de séquence entre elles de 68%. Cependant, seuls les 103 résidus d'acides aminés de l'extrémité carboxyle de ces deux VCPO peuvent être alignés avec les VHPO algales avec une similarité aux alentours de 25%. De plus, cet alignement révèle deux domaines courts très conservés et associés à la liaison du vanadate (voir **partie I.3.1.4**) :

PxYxSGHA
LxxxxAxxRxxxGxHxxxD

3.2.2 Structure quaternaire et mécanismes d'agglomération en solution

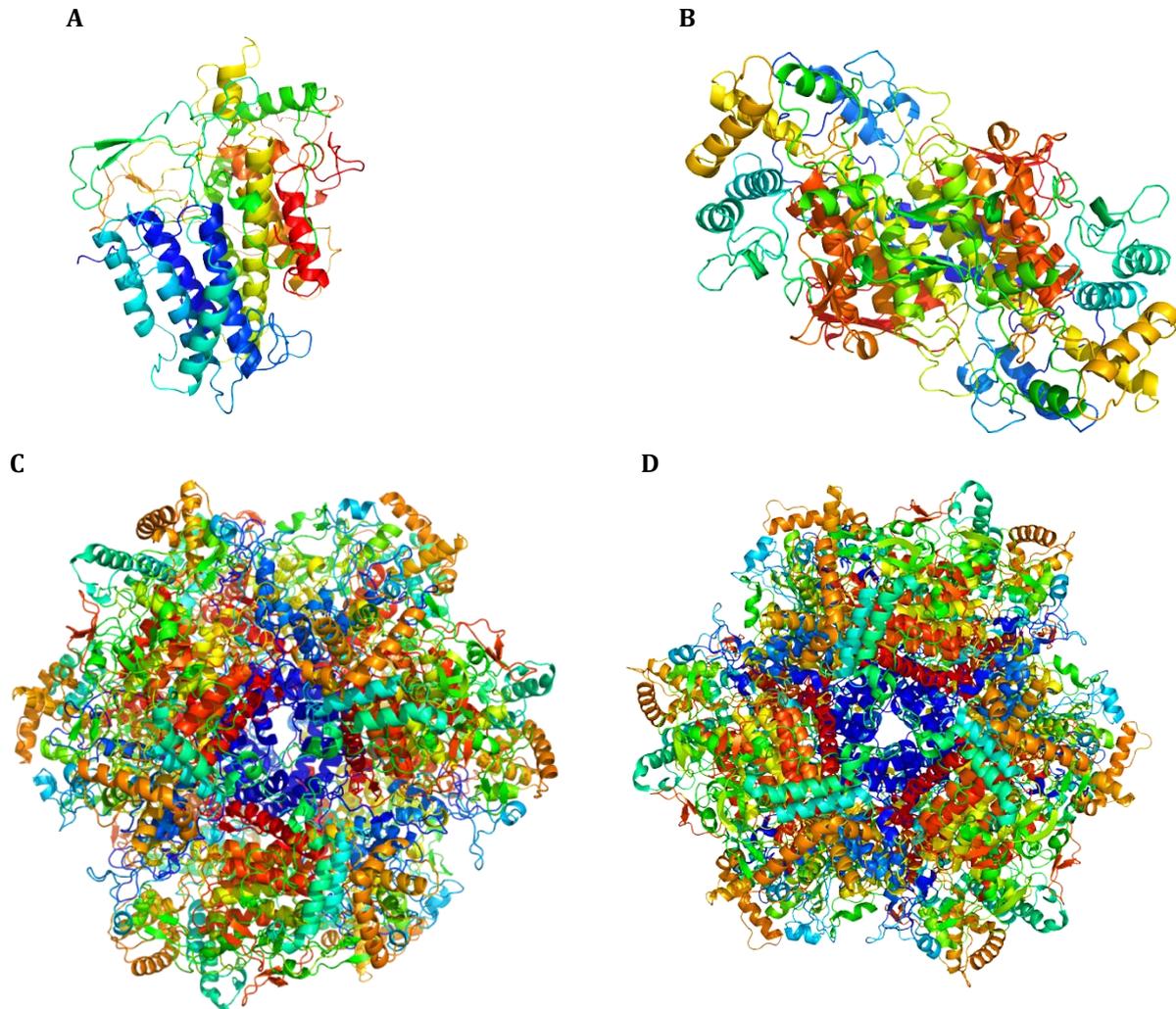
La VCPO isolée de *C. inaequalis* est actuellement la seule VHPO monomérique [Simons *et al.*, 1995], alors que les VHPO d'algues présentent des structures quaternaires plus complexes. L'An-VBPO1 forme un homodimère de 97 kDa [Vilter, 1983b; Wischang *et al.*, 2012] et la seconde isoforme, An-VBPO2, s'assemble en un homohexamère de 420 kDa, composé de sous-unités de 67 kDa [Wischang *et al.*, 2012].

Chez *L. digitata*, les VBPO et VIPO forment des homodimères, mais la première se réarrange spontanément en solution avec d'autres homodimères en complexe de plus haut poids moléculaire [Colin *et al.*, 2003, 2005]. Ce type d'agrégation avait déjà été observé auparavant lors d'études biochimiques de VHPO isolées de laminariales [Almeida *et al.*, 2001]. Les VBPO de *C. pilulifera* et de *C. officinalis* forment quant à elles des homododecamères respectivement de 784 kDa et 768 kDa [Itoh *et al.*, 1986; Sheffield *et al.*, 1993; Shimonishi *et al.*, 1998; Isupov *et al.*, 2000].

3.2.3 Structure tertiaire et conservation d'un domaine structural

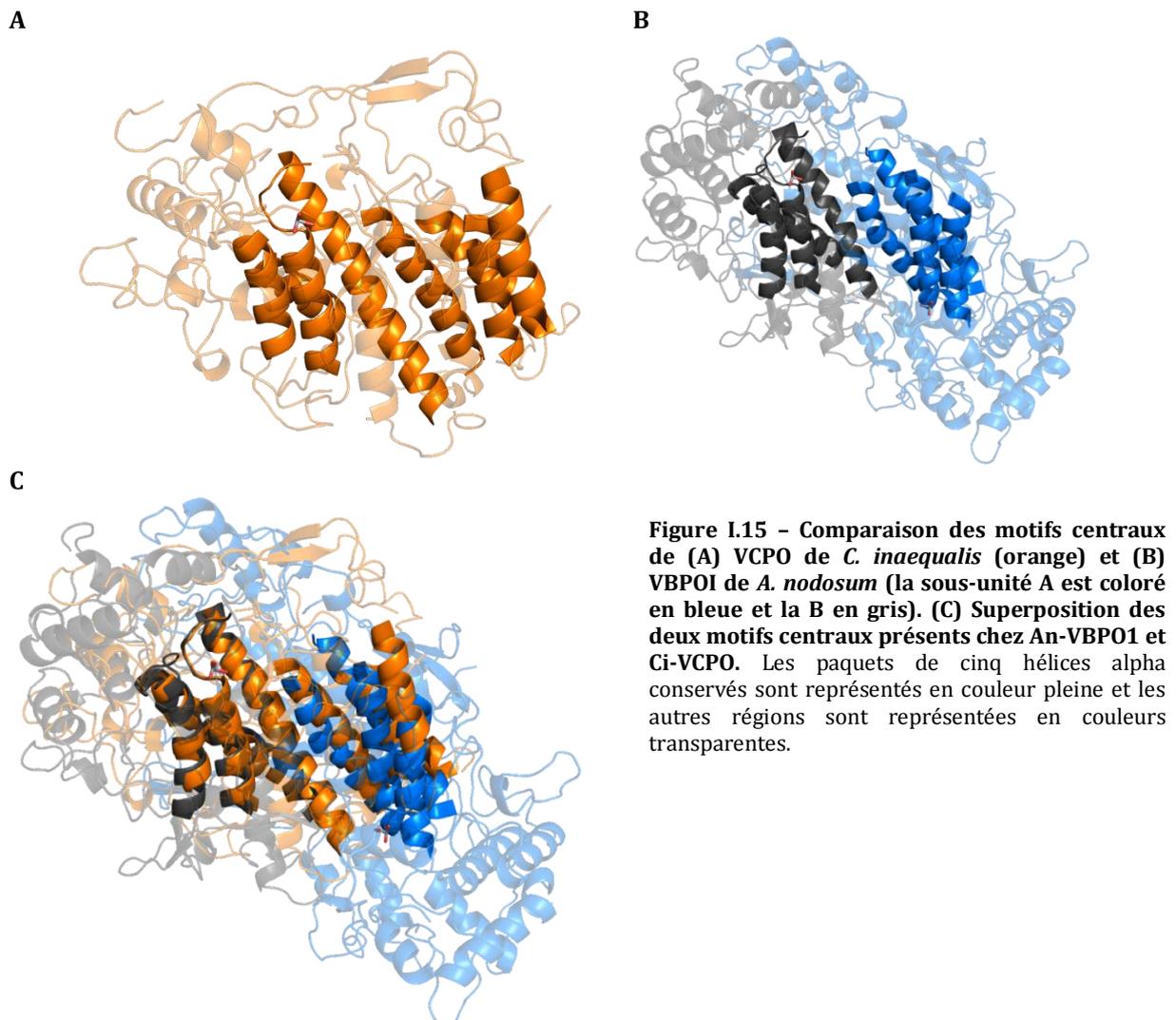
La première structure tridimensionnelle de VHPO a été obtenue pour la forme native de Ci-VCPO avec un dérivé azide du vanadate ($\text{VO}_3\text{-N}_3$) dans le site actif [Messerschmidt and Wever, 1998]. Par la suite, neuf autres structures de Ci-VCPO ont été publiées dans différentes conditions (holo-, peroxy- et apo-enzyme), ainsi que celles de plusieurs mutants de l'enzyme [Messerschmidt *et al.*, 1997; Macedo-Ribeiro *et al.*, 1999a, 2008]. La Ci-VCPO est un monomère de forme cylindrique d'une dimension approximative de 50 x 80 Å. Cette enzyme est composée de 40% d'hélices alpha (20 hélices alpha) et 5% de feuillets beta. Le motif structural central est composé de deux paquets de cinq hélices (**Figure I.14-A et I.15-A**).

Figure I.14 – Structures tridimensionnelles (A) du monomère de VCPO de *C. inaequalis* (PDB code: 1VNI), (B) de l'homo-dimère VBPOI de *A. nodosum* (PDB code: 1QI9) et de deux VBPO homododécamériques de (C) *C. officinalis* (PDB code: 1QHB) et de (D) *C. pilulifera* (PDB code: 1UP8).



Les VHPO de macroalgues présentent des structures 3D plus complexes. Les sous-unités d'An-VBPO1 mesurent approximativement $90 \times 77 \times 75 \text{ \AA}$ [Weyand *et al.*, 1999] et sont aussi composées majoritairement d'hélices alpha (18 par sous-unité) et 8 courts brins beta, formant trois feuilletts beta antiparallèles. Comme dans la Ci-VCPO, le motif structural central se compose de deux paquets de cinq hélices, où chaque monomère fourni un paquet (**Figure I.14-B et I.15-B**). Cet homodimère est stabilisé par trois ponts disulfure intramoléculeaires et deux autres, intermoléculeaires. De plus, Weyand *et al.* [1999] ont décrit la présence sur la surface de l'An-VBPO1 de trois tyrosines mono-iodées. Des analyses de spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS) au seuil K du Br et de spectrométrie de masse ont permis de

démontrer la bromation et l'iodation de deux tyrosines (Tyr447 et Tyr398), à la surface de la protéine [Feiters *et al.*, 2005a].



La VBPO de *C. officinalis* (Co-VBPO) forme un homododécamère, d'un rayon d'environ 150 Å, où chaque sous-unité mesure approximativement 85 x 56 x 55 Å (Figure I.14-C). Les sous-unités sont composées de 19 hélices alpha et 14 brins beta [Isupov *et al.*, 2000]. Cependant dans cette structure, le site actif est occupé par un phosphate inorganique (PO₄). Aucun pont disulfure n'a été caractérisé dans ce complexe.

La quatrième structure déposée dans la *protein data bank* a été obtenue pour la VBPO de *C. pilulifera* (Cp-VBPO) [Littlechild and Garcia-Rodriguez, 2003] (Figure I.14 -D). Celle-ci

présente une structure très semblable à celle de Co-VBPO. Chez Cp-VBPO, un ion calcium est lié à une boucle située à la sortie du site actif pour chaque sous-unité. Cet ion semble contribuer à la stabilité thermique de la forme dodécamérique de l'enzyme [Garcia-Rodriguez *et al.*, 2005]. Certains cristaux de mutants de la Cp-VBPO, incubés dans du bromure de potassium, montrent, comme avec An-VBPO1, une bromation de deux tyrosines en surface [Littlechild *et al.*, 2009]. Néanmoins le rôle de l'halogénéation de ces résidus reste pour le moment inconnu.

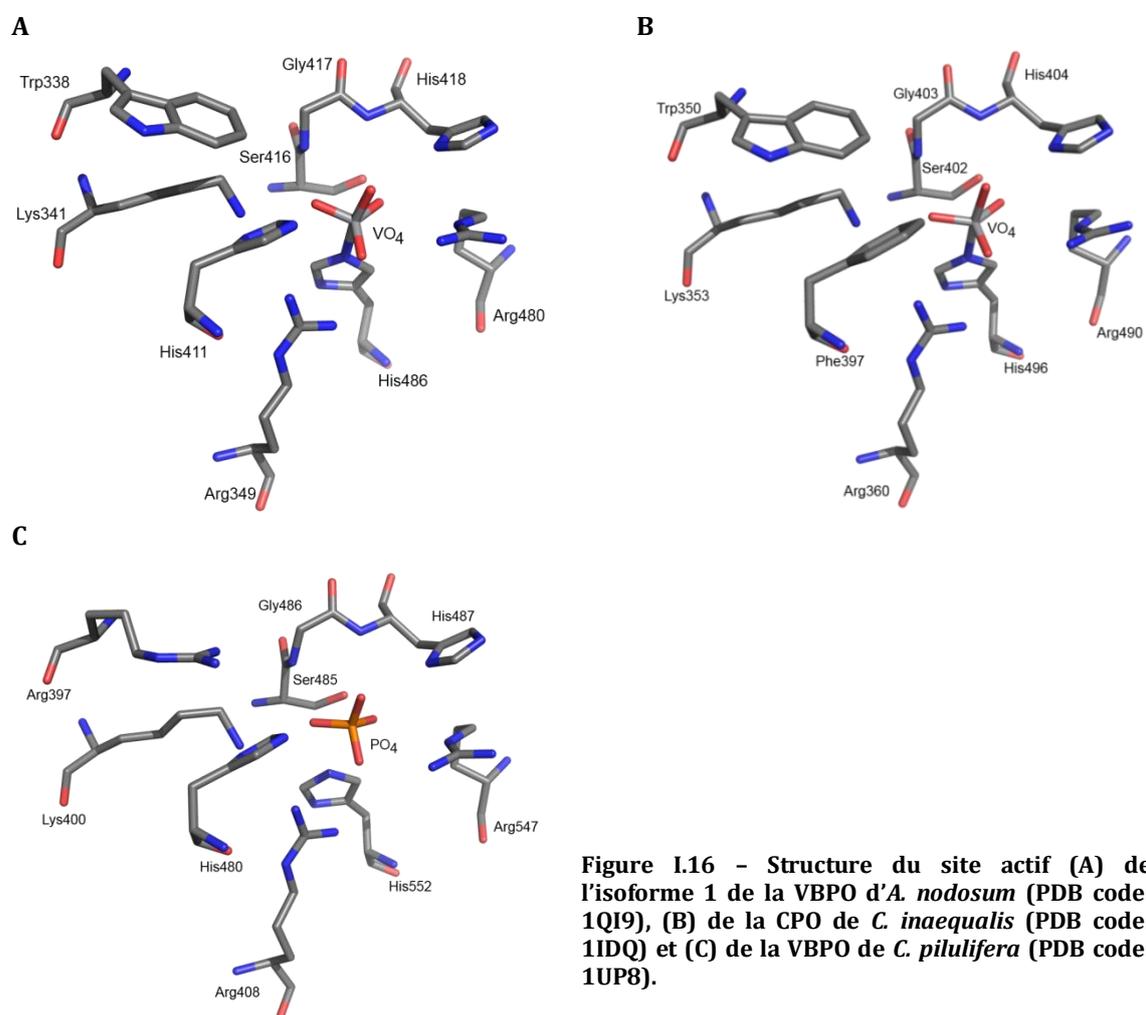
Malgré une faible similarité dans la structure primaire et une large variété de structures quaternaires, les VHPO conservent un motif central composé de deux paquets de cinq hélices alpha contenant le site actif. Ce motif est conservé chez les VBPO, mais celui-ci est composé par deux paquets provenant de chaque sous-unité, et porte un site actif par paquet. Par contre dans Ci-VCPO, ce motif est présent dans le monomère, mais ne porte qu'un seul site actif (**Figure I.15**).

3.2.4 Conservation de la structure du site actif et relations avec certaines phosphatases

Le site de liaison du vanadate est situé du côté N-terminal de l'un des paquets de cinq hélices alpha et est relié à l'extérieur par un tunnel de 15 à 20 Å. Chez Ci-VCPO, il est également couvert partiellement par une boucle. Dans le cas des VBPO, ce tunnel est composé de résidus appartenant aux deux sous-unités. Les sites actifs des VHPO présentent une structure tridimensionnelle très conservée, qui reste inchangée même en absence de vanadate. Douze résidus composent ce site actif chez les VHPO (voir **partie I.3.1.1**) et neuf d'entre eux forment des liaisons hydrogènes avec le vanadate (**Figure I.16**). Sept d'entre eux sont strictement conservés chez toutes les VHPO caractérisées structurellement. Une histidine (His496^{Ci-VCPO} ou His486^{An-VBPO1}) est impliquée dans la liaison du vanadate et la seconde histidine (His404^{Ci-VCPO} ou His418^{An-VBPO1}) serait le résidu catalytique [Messerschmidt and Wever, 1996]. Chez Co-VBPO et Cp-VBPO, les structures tridimensionnelles ont été obtenues sans VO₄ ; les histidines His551^{Co-VBPO} et His552^{Cp-VBPO} sont présentées comme liant le vanadate par homologie structurelle. L'histidine catalytique est toujours précédée par une sérine et une glycine. Une lysine (ex Lys353^{Ci-VCPO}) est aussi présente systématiquement chez les différentes VHPO. Enfin, il existe deux arginines conservées chez toutes les VHPO

(Arg360^{Ci-VCPO} et Arg490^{Ci-VCPO}), l'une d'elle, Arg480^{An-VBPO1} forme une liaison hydrogène avec le résidu Thr275, [Weyand *et al.*, 1999], tandis que chez Ci-VCPO, cette arginine forme un pont salin fort avec l'Asp292 [Messerschmidt *et al.*, 1997].

Chez les VBPO, une troisième histidine (His411^{An-VBPO1}, His479^{Cp-VBPO} et His478^{Co-VBPO}) est remplacée par une phénylalanine chez Ci-VCPO (Phe397). Par ailleurs, un résidu tryptophane (Trp350^{Ci-VCPO} et Trp338^{An-VBPO1}) est substitué par une arginine chez les VBPO d'algues rouges (Arg395^{Co-VBPO} et Arg396^{Cp-VBPO}).



Les analyses des séquences primaires ont révélé que les VHPO partagent des homologies de séquences avec certaines phosphatases (Acide phosphatases non-spécifique (AcP), Glucose-6-phosphatases (G6-P) et certaines lipide-phosphate phosphatases. Trois domaines protéiques (1-3 si dessous) sont conservés dans ces différentes familles

enzymatiques et contiennent les résidus liant le vanadate ou le phosphate [Stukey and Carman, 1997; Neuwald, 1997; Tanaka *et al.*, 2002] :

KxxxxxxRP
PSGH
SRxxxxHxxxD

Les structures tridimensionnelles de deux acide-phosphatases non-spécifiques des bactéries, *Escherichia blattae* (code PDB : 1D2T) et *Salmonella typhimurium* (PDB code: 2A96), présentent un site actif similaire à celui de Ci-VCPO (**Figure I.17**) [Ishikawa *et al.*, 2000; Makde *et al.*, 2007]. Toutefois le tunnel accédant au site actif est plus large chez les AcP par rapport à Ci-VCPO. Un certain nombre de différences entre les AcP et les VHPO seraient à l'origine de l'incapacité des AcP à créer une liaison de type covalent avec le VO₄. Les structures tridimensionnelles des formes apo de Ci-VCPO, Cp-VBPO et Co-VBPO montrent la présence de phosphate dans le site actif, voir celle de métaphosphate (PO₃⁻) lié de façon covalente avec N^{ε2} de l'His496 chez Ci-VCPO [Isupov *et al.*, 2000; Littlechild and Garcia-Rodriguez, 2003; Macedo-Ribeiro *et al.*, 2008].

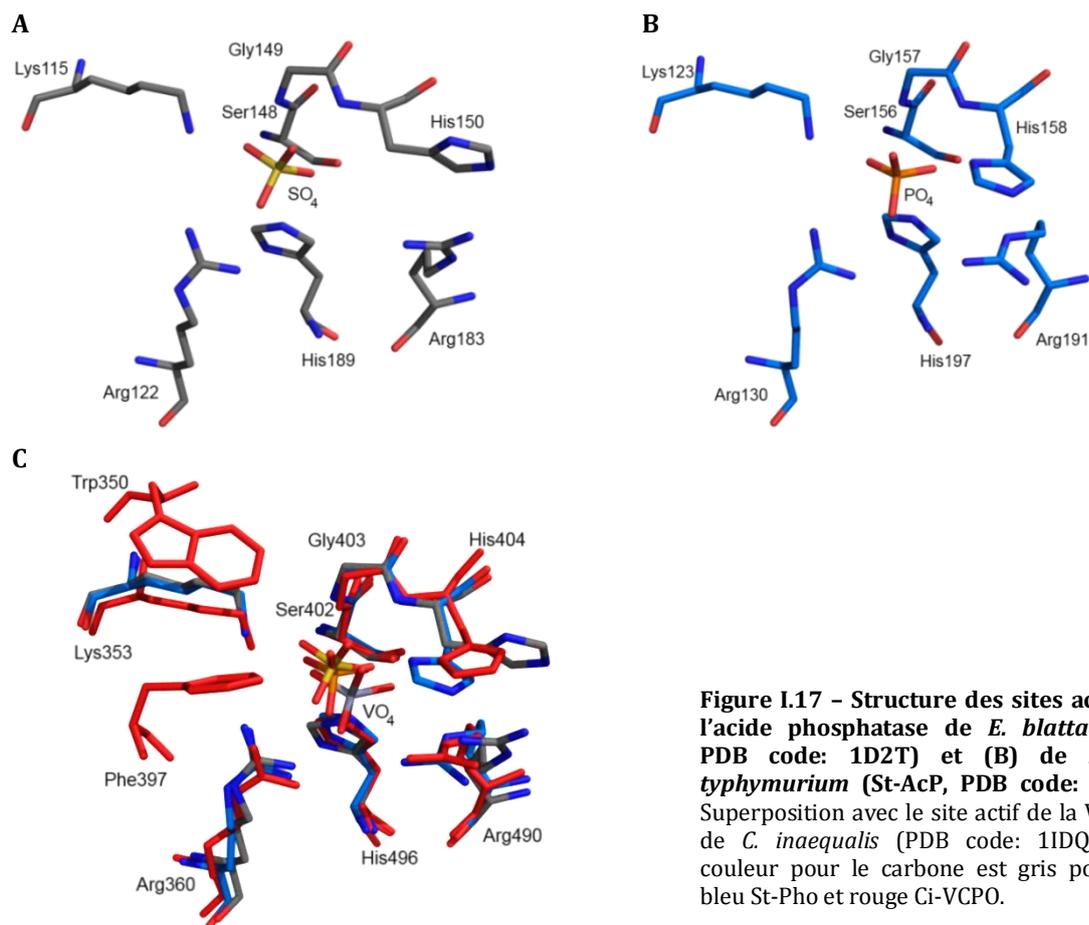


Figure I.17 - Structure des sites actifs de (A) l'acide phosphatase de *E. blattae* (Eb-AcP, PDB code: 1D2T) et (B) de *Salmonella typhimurium* (St-AcP, PDB code: 2A96). (C) Superposition avec le site actif de la VCPO isolée de *C. inaequalis* (PDB code: 1IDQ). Le code couleur pour le carbone est gris pour Eb-Pho, bleu St-Pho et rouge Ci-VCPO.

Le vanadate partage beaucoup de caractéristiques physico-chimiques avec le phosphate (PO₄), mais certaines différences existent comme l'état de protonation, la capacité de réduction et le nombre de coordinations. Les deux oxyanions sont capables de se substituer l'un à l'autre dans le site actif des acide phosphatases ou des VHPO, et d'inhiber l'activité des enzymes [Vescina *et al.*, 1996; Ullah *et al.*, 2011].

La structure tridimensionnelle de l'AcP prostatique du rat a été ainsi obtenue avec un vanadate positionné dans le site actif [Lindqvist *et al.*, 1994]. De plus, deux autres AcP isolées des bactéries *Shigella flexneri* et *Salmonella typhimurium* montrent en présence de vanadate une très faible activité bromoperoxydase, 10⁵ fois plus faible que celle mesurée pour An-VBPO1 [Tanaka *et al.*, 2002]. En parallèle, une activité phosphatase a été caractérisée pour la forme apo de Ci-VCPO en présence de phosphate, qui est aussi capable d'hydrolyser le *p*-nitrophényle phosphate (*p*-NPP) [Hemrika *et al.*, 1997; Renirie *et al.*, 2000b; Macedo-Ribeiro *et al.*, 2008]. Des résultats semblables ont été obtenus avec la forme apo d'An-VBPO1 en

présence de phosphate. Cette activité reste cependant inférieure à celle observée pour l'AcP de *Shigella flexneri* [Tanaka *et al.*, 2003a].

Les VHPO montrent aussi des similarités de séquences protéiques avec la glucose-6-phosphatase humaine (H-G6P) qui possède 9 hélices transmembranaires [Hemrika *et al.*, 1997]. L'His119 de la G6-P est essentielle à l'activité de l'enzyme [Lei *et al.*, 1995] et est conservée chez les VHPO (position équivalente à l'His404^{Ci-VCPO} ou His418^{An-VBPO1}). Le résidu Arg83 de la H-G6P, nécessaire à l'activité catalytique, correspond à l'Arg360 de Ci-VCPO (cf. **partie I.3.4**). Hemrika *et al.* [1997] ont donc proposé que certaines phosphatases et les VHPO aient divergé d'un même ancêtre commun.

3.2.5 Coordination fine du vanadate au sein du site actif

Le groupe prosthétique présent chez les VHPO est un vanadate (VO₄) [Vilter, 1983a; Wever *et al.*, 1985]. Chez les VHPO isolées à partir d'algues, le ratio de vanadate par sous-unités d'enzymes est souvent inférieur à 1. Par exemple chez An-VBPO2, ce ratio est de 0,5 [Wischang *et al.*, 2012]. La liaison du vanadate à l'enzyme est nécessaire pour l'activité catalytique de cette dernière [Hemrika *et al.*, 1999], car en absence de groupement prosthétique les VHPO perdent totalement leur capacité à oxyder un halogénure. Les apo-enzymes sont cependant capables de lier d'autre oxyanions comme le phosphate (PO₄), mais avec des affinités moins importantes (Affinités : HVO₄²⁻ > HPO₄²⁻ > AsO₄³⁻ > MoO₄²⁻) [de Boer *et al.*, 1988; Tromp *et al.*, 1990]. Dans le cas du tungstate ou du phosphate, ces oxyanions se lient de manière similaire au vanadate dans la forme native de Ci-VCPO, Cp-VBPO ou Co-VBPO [Messerschmidt and Wever, 1998; Isupov *et al.*, 2000; Garcia-Rodriguez *et al.*, 2005], mais plus faiblement au N^ε2 de l'histidine (ex. His496^{Ci-VCPO}). Étonnamment, une faible activité peroxydase a été détectée pour une VIPO purifié à partir de *Pelvetia canaliculata* avec d'autre oxyanions tels que le MoO₄, le MnSO₄ et le C₆H₅FeO₇ ainsi qu'avec l'An-VBPO1 [Vilter, 1984; Almeida *et al.*, 2000].

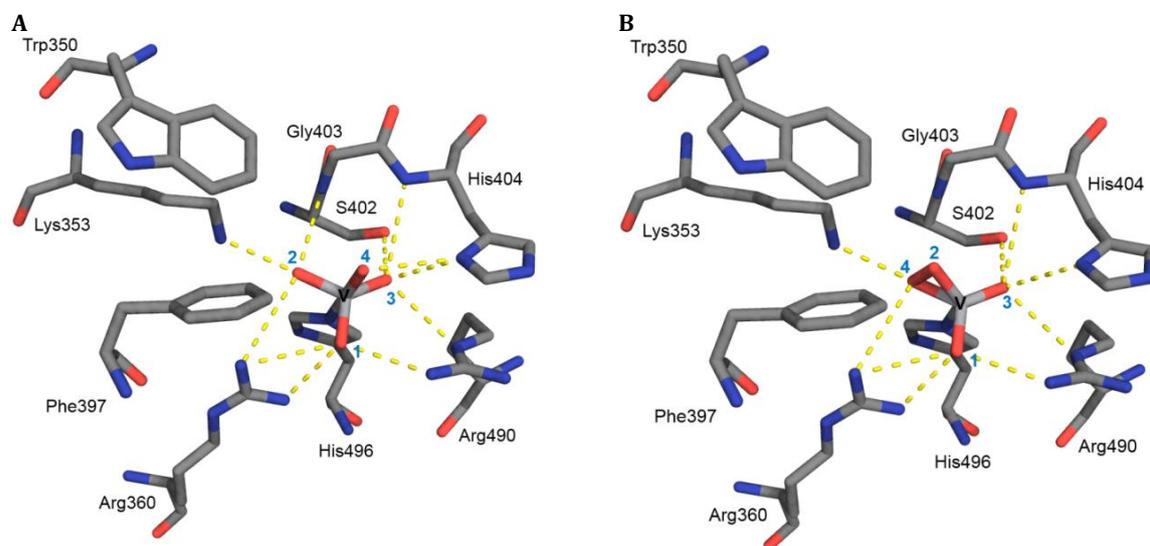
L'affinité pour le vanadate est sensible au pH. La constante de dissociation (*K_d*) pour le vanadate de An-VBPO1 augmente de 55 nM à pH 8,5 à 10 μM à pH 6 [Vilter, 1983a; Tromp *et al.*, 1990]. Pour Ci-VCPO, cette constante reste stable à 150 nM de pH 7,0 à 8,5, mais pour des valeurs de pH plus faibles, cette constante augmente jusqu'à 1 μM à pH 5,3 [van Schijndel *et al.*, 1993]. Le pH de l'eau de mer en surface étant de l'ordre de pH 8,1 [Millero, 2007], les

KdVO₄ pour les VHPO sont proches de la concentration en vanadium de l'eau de mer qui est de 50 nM [Jeandel *et al.*, 1987].

D'après les études cristallographiques, la coordination du vanadium peut être décrite sous la forme d'une bipyramide à base trigonale où trois oxygènes sont sur le plan équatorial [Messerschmidt and Wever, 1996; Weyand *et al.*, 1999; Isupov *et al.*, 2000; Littlechild and Garcia-Rodriguez, 2003]. Le quatrième oxygène du vanadate est apical et la cinquième position de coordination du vanadium est occupée par l'azote N^{ε2} de l'histidine [Messerschmidt and Wever, 1996; Weyand *et al.*, 1999; Rehder *et al.*, 2004] (**Figure I.18**).

Dans le site actif, les charges négatives du vanadate sont compensées par la formation de liaison hydrogène avec des résidus chargés positivement ou hydrophobes, ou avec des molécules d'H₂O. Chez Ci-VCPO, les résidus Lys353, Arg360, Ser402, Gly403 et Arg490 forment des liaisons hydrogènes avec les groupements oxo et hydroxo équatoriaux [Macedo-Ribeiro *et al.*, 1999a] (**Figure I.18-A**). Chez les VBPO, la troisième histidine (ex. : His411^{An-VBPO1}) forme deux liaisons hydrogènes supplémentaires avec l'O2 du vanadate et une arginine (Arg411^{An-VBPO}). Macedo-Ribeiro et collaborateurs [1999a] ont proposé que l'histidine catalytique (ex. : His404^{Ci-VCPO}) forme aussi une liaison hydrogène avec l'oxygène apical O4 du vanadate augmentant sa nucléophilie. L'une des arginines (ex. : Arg349^{An-VBPO1} ou Arg360^{Ci-VCPO}) et la lysine (ex. : Lys341^{An-VBPO1} ou Lys353^{Ci-VCPO}) sont stabilisées par des liaisons hydrogènes avec les oxygène O1 et O2 de VO₄ (**Figure I.18-A**).

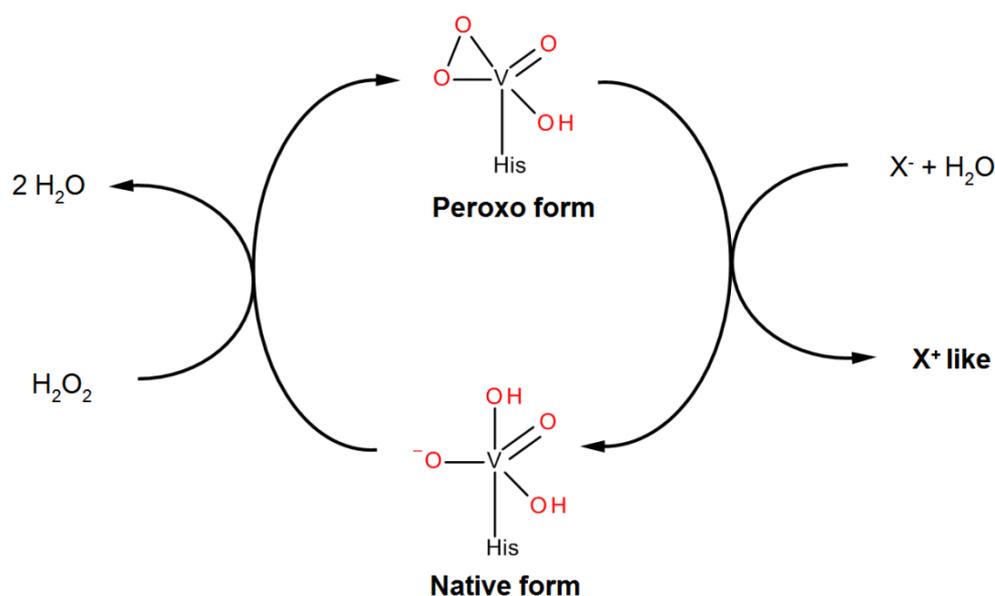
Figure I.18 – Centre catalytique de la VCPO de *C. inaequalis* sous (A) la forme native (code PDB: 1IDQ) et (B) la forme peroxy-vanadate (code PDB: 1IDU) obtenue par cristallographie. Le vanadium est représenté en gris, l'oxygène en rouge (numérotation suivant Messerschmidt *et al.*, 1997), l'azote en bleu et le carbone en gris foncé. Les liaisons hydrogènes sont modélisées avec Pymol (<http://www.pymol.org>).



3.3 Cycle catalytique et spécificité des VHPO

Les haloperoxydases à vanadium (numéro EC des VCPO : 1.11.1.10 ; VBPO : 1.11.1.18 ; VIPO : 1.11.1.8) catalysent l'oxydation à deux électrons d'un halogénure (noté X^-) formant ainsi un intermédiaire appelé « X^+ -like » (HOX , X_2 , X_3^-) (**Figure I.19**). Le cycle catalytique des VHPO peut être décomposé en deux étapes, (i) tout d'abord le peroxyde d'hydrogène réagit avec le vanadate à l'origine de la formation du complexe stable peroxy-vanadate ; (ii) puis l'halogénure (X^-) est oxydé suivant un mécanisme de type bi-bi-ping-pong [Everett, 1990; Everett *et al.*, 1990a]. Le produit formé lors de cette réaction serait l'acide hypohalogéneux (HOX) [Messerschmidt and Wever, 1996; Butler, 1999]. En solution aqueuse, l' HOX est rapidement en équilibre avec l'halogénure moléculaire (X_2) et le trihalogène (X_3^-) (**Figure I.19**) [Wischang and Hartung, 2011]. Ces espèces sont très réactives et peuvent ensuite halogéner des substrats organiques de manière non enzymatique.

Figure I.19 – Cycle catalytique hypothétique des haloperoxydases dépendantes du vanadium.



3.3.1 Coordination fine du vanadate au cours du cycle catalytique

Les structures fines autour du vanadate de Ci-VCPO [Renirie *et al.*, 2010] et An-VBPO1 [Arber *et al.*, 1989; Kostenko *et al.*, 2008] ont été obtenues par spectrométrie d'absorption des rayons X (XAS) au seuil K du vanadium. Pour ces deux enzymes natives, une double liaison entre un oxygène équatorial et le vanadium a été modélisée. Deux liaisons covalentes de longueur moyenne ont été attribuées aux deux autres liaisons V-O_{équatorial}. Les deux liaisons les plus longues sont quant à elles assignées aux liaisons V-N^{ε2} et V-O_{apical} (**Tableau I.5**). Une étude récente de Ci-VCPO présente la géométrie de coordination du VO₄ comme une pyramide à base carrée distordue [Renirie *et al.*, 2010]. Pour ces auteurs, la double liaison V=O reste présente dans la forme peroxy-vanadate et semble être conservée durant la suite du cycle catalytique.

Tableau I.5 – Comparaison des distances interatomiques (Å) de la forme native et peroxy-vanadate de Ci-VCPO et An-VBPO1, obtenues par XAS au seuil K du vanadium.

	Ci-VCPO ^a		An-VBPO ^b		An-VBPO ^c	
	native	peroxo	native	peroxo	native	peroxo
V-N	2.02	1.93	2.11		2.09	1.94
V-O_{apical}	1.95	1.88	2.11		1.93	1.94
V-O_{équatorial}	1.69	1.67	1.72		1.63	1.91
V-O_{équatorial}	1.69	1.67	1.72		1.83	1.92
V-O_{équatorial}	1.54	1.54	1.61		1.66	1.71
Angle N-V-O_{apical}	172°					

^a Renirie *et al.*, 2010; ^b Arber *et al.*, 1989 ; ^c Kostenko *et al.*, 2008

Durant le cycle catalytique, le vanadate réagit avec le peroxyde d'hydrogène, et forme l'intermédiaire peroxy-vanadate, où une liaison peroxy (O-O) est créée entre un oxygène équatorial (O2), lié par une liaison hydrogène avec la lysine, et l'oxygène apical (O4) [Renirie *et al.*, 2010] (**Figure I.18-B**). Dans l'intermédiaire peroxy-vanadate de Ci-VCPO, la liaison peroxy est orientée face au résidu Phe357 [Messerschmidt *et al.*, 1997]. Chez An-VBPO1, cette liaison semble former une liaison hydrogène avec l'atome N^{δ1} de l'His411 [Weyand *et al.*, 1999]. Au cours du cycle catalytique l'état d'oxydation du vanadium reste (V), son état d'oxydation le plus élevé pour la forme native et la forme peroxy vanadate [de Boer *et al.*, 1986; Vilter and Rehder, 1987; de Boer and Wever, 1988; Hormes *et al.*, 1988; Arber *et al.*, 1989; Krenn *et al.*, 1989; Küsthardt *et al.*, 1993; Renirie *et al.*, 2010] Lorsque le vanadium est réduit par le dithiothréitol (DTT) à l'état d'oxydation (IV), l'enzyme perd son activité. Enfin chez An-VBPO1, aucune modification significative de la coordination locale du vanadate n'a été observée lors d'une modification du pH [Küsthardt *et al.*, 1993].

3.3.2 Inhibition des VHPO

Il a été rapporté plusieurs fois que les VHPO étaient inhibées en présence de phosphate (PO₄) en conditions acides [Vilter, 1984; de Boer *et al.*, 1986; Krenn *et al.*, 1989]. Initialement deux hypothèses ont été émises; (1) la formation d'un complexe phosphate-vanadate, (2) la formation d'un complexe EDTA- ou acide citrique –vanadate dans le site actif [Vilter, 1984]. Il est actuellement accepté que le phosphate se substitue au vanadate dans le site actif ($K_i^{PO_4} = 60 \mu\text{M}$) [Tromp *et al.*, 1990]. D'autres anions, tels que P₂O₇⁴⁻, AsO₄³⁻, AlF₄⁻ et BeF₄²⁻, ont aussi été décrits comme des inhibiteurs de VHPO [Tromp *et al.*, 1991]. Les VBPO et VCPO isolées respectivement de *Xantoria parietina* et *C. inaequalis* sont inhibées par le nitrate (NO₃⁻)

[Wever *et al.*, 1988]. NO_3^- inhibe l'activité chloroperoxydase de façon compétitive avec le chlorure et de manière non compétitive avec le peroxyde d'hydrogène ($K_i^{\text{NO}_3^-} = 2 \mu\text{M}$) [Van Schijndel *et al.*, 1994].

Les substrats des VHPO peuvent aussi jouer le rôle d'inhibiteur. Par exemple, une forte concentration d'halogénures (F^- , Cl^- et Br^-) inhibe l'activité des VHPO, en particulier à un pH acide [Wever *et al.*, 1988; Van Schijndel *et al.*, 1994]. Le fluorure (F^-), tout comme le bromure (Br^-), sont aussi des inhibiteurs de la réaction du H_2O_2 avec le vanadate chez An-VBPO1 [Everett *et al.*, 1990b]. Le peroxyde d'hydrogène est quant à lui un inhibiteur non compétitif de la liaison des halogénures à pH basique [Soedjak *et al.*, 1995]. Chez Ci-VCPO, l'histidine catalytique ($\text{His404}^{\text{Ci-VCPO}}$) semble être impliquée dans ces mécanismes d'inhibition par l' H_2O_2 . Cette inhibition est réversible par l'ajout de vanadate dans certaines conditions (pH 4-5, H_2O_2 100mM, KBr 100 mM) et pourrait être due à la formation d'un complexe 2-oxohistidine [Winter and Butler, 1996]. Les mécanismes des inhibitions par les substrats sont encore mal compris mais ceux-ci semblent être différents suivant les substrats.

3.3.3 Première étape du cycle catalytique : réaction avec le peroxyde d'hydrogène

La première étape du cycle catalytique est la mieux caractérisée. Pour Ci-VCPO, la constante d'affinité pour H_2O_2 ($K_m^{\text{H}_2\text{O}_2}$), à pH neutre, est de l'ordre de $1 \mu\text{M}$, mais varie en fonction du pH [van Schijndel *et al.*, 1993; Van Schijndel *et al.*, 1994]. Chez An-VBPO1, le $K_m^{\text{H}_2\text{O}_2}$ est aussi sensible au pH ; l'affinité augmente entre pH 4 et 6, puis au-dessus de pH 6, le $K_m^{\text{H}_2\text{O}_2}$ reste constant [Wever *et al.*, 1985]. Comme la liaison du peroxyde d'hydrogène est sensible au pH, il est proposé que les VHPO doivent être non-protonées pour réagir efficacement avec l' H_2O_2 [Van Schijndel *et al.*, 1994]. Les VHPO sont aussi capables de réagir avec d'autres agents oxydants, tels que certains peracides, pour oxyder des halogénures par un mécanisme qui reste incompris [Soedjak and Butler, 1990].

Chez An-VBPO1, la lysine présente dans le site actif n'interagit pas avec la liaison peroxy ($\text{O}_2\text{-O}_4$), contrairement à celle présente chez Ci-VCPO (ex. : $\text{Lys353}^{\text{Ci-VCPO}}$). Pour Hemrika et collaborateurs [1999], le rôle de cette lysine chez Ci-VCPO permet de polariser la liaison peroxy en formant une liaison hydrogène avec l'oxygène O_4 . L'affinité pour le substrat des VHPO dépend du pH, de ce fait certaines hypothèses proposent que l'état de

protonation du vanadate soit important pour sa réactivité avec le peroxyde d'hydrogène, puis avec les halogénures. Des modélisations *in silico* par des analyses mathématiques fondées sur la théorie de la fonctionnelle de la densité (*density functional theory*, DFT) confirment le rôle de la protonation dans l'activation du complexe peroxy-vanadate [Zampella *et al.*, 2005] et les conclusions de cette étude sont en accord avec les résultats expérimentaux montrant l'importance du pH sur l'étape d'oxydation [Colpas *et al.*, 1996; Hemrika *et al.*, 1999; Kimblin *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2003b]. A la différence de la première étape du cycle catalytique qui est relativement bien caractérisé et bien compris. La seconde étape du cycle reste encore inexplorée et fera l'objet de la prochaine partie.

3.3.4 Site de liaison des halogénures et mécanismes d'oxydation

Afin de comprendre les mécanismes de spécificité des VHPO vis-à-vis des halogénures (Cl⁻, Br⁻ et I⁻), plusieurs études ont été menées pour localiser un site de liaison des halogénures chez les VHPO par différentes approches, telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN) du ⁵¹V et de l'¹²⁷I [Vilter and Rehder, 1987; Arber *et al.*, 1989; Rehder *et al.*, 1991; Christmann *et al.*, 2004] ou le trempage de cristaux d'An-VBPO1 dans de l'iodure de potassium [Weyand *et al.*, 1999]. Toutes ces analyses n'ont pas montré clairement de sites de liaison directe des halogénures au sein des protéines.

Certains auteurs proposent la formation d'un complexe O₃NV-O-X durant le cycle catalytique [de Boer and Wever, 1988; Van Schijndel *et al.*, 1994]. Une étude réalisée par modélisation et DFT supporte cette hypothèse d'une attaque nucléophile de l'halogénure sur l'oxygène pseudo-axial [Zampella *et al.*, 2004].

Cependant plusieurs études indépendantes utilisant la spectroscopie d'absorption de rayons X (EXAFS ; *Extended X-Ray Absorption Fine Structure*) au seuil K du Br et du V avec An-VBPO1 ou Ci-VCPO ont conclu qu'il n'y avait pas de liaison directe de l'halogénure avec le vanadate [Dau *et al.*, 1999; Christmann *et al.*, 2004; Feiters *et al.*, 2005b; Renirie *et al.*, 2010].

Pour Christmann *et al.* [2004], chez An-VBPO1, le bromure semble se lier à un atome de carbone situé à environ 4 Å du vanadium et hybridé en sp² comme dans le cas d'un carbone présent dans un cycle aromatique. De la même manière, l'analyse de la carte de densité obtenue pour le mutant Arg397Trp de Cp-VBPO, trempé dans du bromure de potassium,

révèle la présence de bromure en face du Trp [Littlechild *et al.*, 2009]. Ce résidu forme une poche hydrophobe avec d'autres acides aminés proches du vanadate. La liaison du bromure dans cette poche engendre une réduction du diamètre du tunnel, permettant le déplacement d'un résidu (Leu337^{Cp-VBPO}) et l'accès au site actif. Enfin d'autres analyses EXAFS au seuil K du Br suggère que chez An-VBPO1, la sérine du site actif (Ser416^{An-VBPO1}) présente une liaison C-Br durant le cycle catalytique [Dau *et al.*, 1999]. Néanmoins ces conclusions n'ont pas été confirmées par les études de mutagenèse dirigée (voir **partie I.3.4**) [Tanaka *et al.*, 2003b]. En conséquence, aucune étude n'a permis de déterminer un site de liaison indiscutable de l'halogénure dans le site catalytique ou en périphérie.

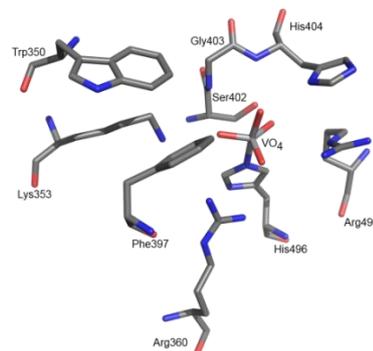
Comme pour le peroxyde d'hydrogène, le K_m pour le chlorure est dépendant du pH, à l'inverse du $K_m^{Br^-}$ qui est insensible à l'effet du pH. Aussi il semblerait que l'oxydation du chlorure nécessiterait la protonation du complexe peroxy-vanadate [Van Schijndel *et al.*, 1994; Hemrika *et al.*, 1999; Renirie *et al.*, 2000b]. Ces résultats mettent en lumière une étape clé du cycle catalytique, le transfert oxo, qui implique l'attaque nucléophile par l'halogénure de l'atome d'oxygène pseudoaxial (O4) non protoné de la liaison peroxy [Zampella *et al.*, 2005].

3.4 Exploration des mécanismes catalytiques par des approches de mutagenèse dirigée

Durant ces vingt dernières années, plusieurs études ont été menées pour comprendre le rôle fonctionnel des différents acides aminés composant le site actif par des approches de mutagenèse dirigée (**Tableau I.6**). Les structures tridimensionnelles de quatre mutants de Ci-VCPO ont été obtenues en parallèle à des études enzymatiques. Les mutations de résidus du site actif n'induisent pas de modifications importantes de la structure des protéines mutantes par rapport à celle de la protéine recombinante de type sauvage (WT) [Macedo-Ribeiro *et al.*, 1999a]. En effet, l'espace créé par la mutation est comblé par des molécules d'eau qui remplacent partiellement le réseau de liaisons hydrogènes autour du vanadate.

Tableau I.6 – Tableau récapitulatif des résidus autour du vanadate chez les différents VHPO. Les résidus mutés sont surlignés en gris. A droite, rappel du site actif de Ci-VCPO (PDB code : 1VNC)

Nom	Résidus du site actif autour du vanadate								
Ci-VCPO	Trp350	Lys353	Arg360	Phe397	Ser402	Gly403	His404	Arg490	His496
An-VBPO1	Trp338	Lys341	Arg349	His411	Ser416	Gly417	His418	Arg480	His486
Co-VBPO	Arg395	Lys398	Arg406	His478	Ser483	Gly484	His485	Arg545	His551
Cp-VBPO	Arg397	Lys400	Arg408	His480	Ser485	Gly486	His487	Arg547	His553
Gc-VBPO	Arg379								



3.4.1 Les résidus impliqués dans le cycle catalytique et la stabilisation du complexe peroxy-vanadate

Comme vu précédemment, la liaison peroxy fait face à l'histidine (ex. : His411^{An-VBPO}) ou la phénylalanine (Phe397^{Ci-VCPO}) et la lysine. Cette lysine (ex Lys353^{Ci-VCPO}) forme une liaison hydrogène avec l'oxygène O4 ce qui polarise la liaison peroxy et rend l'oxygène pseudo axial (O2) plus susceptible à l'attaque nucléophile d'un halogénure (**Figure I.18**) [Hamstra *et al.*, 1998]. La substitution de la phénylalanine chez Ci-VCPO par une histidine chez les VBPO dans le site actif modifie le réseau de liaisons hydrogènes avec le peroxy-vanadate et provoque une déprotonation de l'oxygène pseudo-apical. Cette modification pourrait donc jouer un rôle dans les mécanismes de spécificité en empêchant la réaction avec le chlorure, plus électronégatif (**Figure I.20** ; voir **partie I.0**).

L'état de protonation du peroxy-vanadate, contrôlé en partie par la présence de la Phe397, pourrait expliquer le profil d'activité des VCPO en fonction du pH. La mutation de la Pro395 chez Ci-VCPO en Glu, Asp et Thr augmente l'activité chloroperoxydase à pH 8 [Hasan *et al.*, 2006]. Ce résidu se situe à l'extérieur du site actif mais les auteurs proposent que ces mutations, en modifiant l'environnement électrostatique et l'orientation de la Phe397, perturbent les charges dans l'environnement du VO₄.

La mutation en alanine de résidus basiques du site actif (Arg360, Lys353, Arg490) génère une augmentation des charges négatives du VO₄ du fait de la suppression des résidus compensant ces charges, par des liaisons hydrogènes. La mutation Lys353Ala induit d'importantes modifications de l'activité enzymatique en augmentant les K_m pour H₂O₂ et pour Br⁻, et en abolissant l'activité VCPO [Hemrika *et al.*, 1999]. Cette mutation supprime une

liaison hydrogène forte avec l'atome d'oxygène équatorial O2, impliqué dans la liaison peroxy avec O4 et perturbe la polarisation de cette liaison peroxy. Les mutations Arg490Ala et Arg360Ala provoquent respectivement une perte et une réduction importante de l'activité VCPO, ces deux résidus forment des liaisons hydrogènes avec les oxygènes équatoriaux du vanadate [Renirie *et al.*, 2000a]. De plus, la mutation Arg490Ala affecte la liaison du vanadate à l'enzyme [Renirie *et al.*, 2000b]. Ces changements d'activité seraient dus à la modification des charges des oxygènes du VO₄, perturbant la réactivité de ce dernier.

La Ser402^{Ci-VCPO} serait impliquée dans la liaison avec le bromure d'après Dau *et al.* [1999]. Cependant si la mutation Ser402Ala induit une forte diminution des activités chloro- et bromoperoxydases (respectivement 95 % et 80 % à pH 4,5 par rapport au WT), les valeurs de K_m restent comparables pour le Br⁻ et l'H₂O₂ à celles obtenues pour l'enzyme WT. Le $K_m^{Cl^-}$ de l'enzyme mutante est quant à lui augmenté d'un facteur 10 à pH 8. Les auteurs suggèrent donc que ce résidu ne serait pas crucial pour la liaison de l'halogénure, ni pour l'activité enzymatique [Tanaka *et al.*, 2003b].

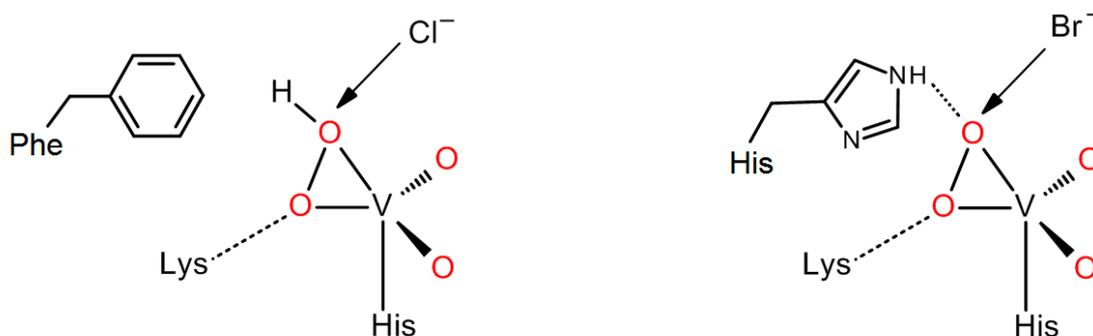
La mutation de l'His404 en alanine chez Ci-VCPO provoque une perte de l'activité enzymatique et cette histidine pourrait donc jouer le rôle de résidu catalytique [Hemrika *et al.*, 1999]. Cependant comme cette mutation induit aussi d'importantes modifications de la structure du site actif et provoque la rupture du pont salin entre l'Arg490 et l'Asp292 [Macedo-Ribeiro *et al.*, 1999a], les auteurs n'ont pas pu conclure sur le rôle précis de ce résidu. L'His404 semble former une liaison hydrogène avec l'oxygène pseudo-axial (O4) du vanadate, perturbant ainsi la liaison du H₂O₂ suivant le pH et donc l'état de protonation de ce résidu [Van Schijndel *et al.*, 1994]. Pour Renirie *et al.* [2000a], l'His404^{Ci-VCPO} jouerait un rôle de groupe acido-basique durant le cycle catalytique et fournirait le proton nécessaire à la libération du produit de l'oxydation (HOX). Mais l'activité des VHPO est aussi régulée par les autres résidus présents dans le site actif. Ces derniers sont impliqués dans différents mécanismes tels que la fixation du VO₄ (ex. : Arg490^{Ci-VCPO}), l'affinité pour les substrats ou encore le changement de pH optimal. En effet l'état de protonation et les configurations structurales des résidus présents dans le site actif contrôlent les charges et la protonation des différents oxygènes du vanadate. Ces variations modulent le potentiel redox du vanadate et modifient directement les capacités des VHPO à oxyder certains halogénures, c'est-à-dire leur spécificité enzymatique.

Les rôles des différents résidus présents dans le site actif sont encore mal compris du fait du manque de parallélisme entre les études menées avec Ci-VCPO et avec les autres VHPO. De plus l'utilisation de tests enzymatiques indirects qui conduit à certaines approximations et que le produit de l'oxydation reste encore inconnu.

3.4.2 Spécificité des VHPO envers les halogénures

La principale différence entre le site actif d'une VBPO et d'une VCPO est la présence d'une phénylalanine (Phe397^{Ci-VCPO}) au lieu d'une histidine (ex. : His411^{An-VBPO1}; cf. **Figure I.16**). L'histidine des VBPO produit de légères modifications de la structure du site actif et crée deux liaisons hydrogènes supplémentaires, une première avec la lysine voisine et la seconde avec l'atome d'oxygène O2, impliqué dans la liaison peroxy (**Figure I.20**). Pour Hemrika *et al.* [1999], dans le cas où l'oxygène (O2) est moins chargé positivement, il sera alors moins susceptible d'une attaque nucléophile par le chlorure.

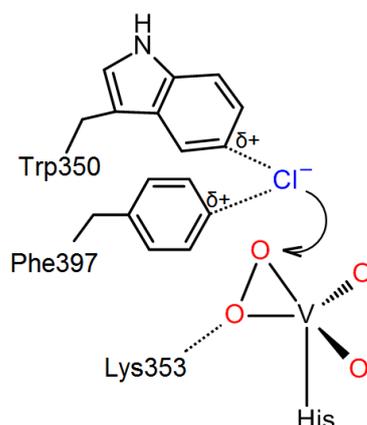
Figure I.20 – Mécanisme hypothétique du changement de spécificité chez les VHPO. La substitution de la phénylalanine (VCPO, gauche) par une histidine chez les VBPO (droite) dans le site actif modifierait le réseau de liaison hydrogène avec le peroxy-vanadate.



D'après une seconde hypothèse présentée auparavant par Messerschmidt et Wever [1996], la liaison du chlorure dans le site actif serait favorisée par la présence d'une région positive grâce aux résidus Phe397 et Trp350 chez Ci-VCPO (δ^+ ; **Figure I.21**). La mutation de la Phe397 en histidine chez Ci-VCPO conduit d'ailleurs à la diminution de l'activité chloroperoxydase mais aussi bromoperoxydase. Cette mutation semble donc modifier l'affinité de l'enzyme pour les halogénures [Tanaka *et al.*, 2003b].

Une autre piste peut expliquer les différences de spécificité entre VCPO et VBPO. Chez An-VBPO1, l'atome Nⁿ² du résidu His418 forme une liaison hydrogène forte avec l'Asp278 [Weyand *et al.*, 1999], tandis que chez Ci-VCPO, l'His404 ne forme pas de liaison hydrogène avec un acide aspartique, mais avec l'oxygène du carbonyle du Trp289 et de l'Ala290 [Messerschmidt *et al.*, 1997]. La présence de liaisons hydrogènes soit avec l'Asp278 chez An-VBPO1, soit avec le Trp289 et l'Ala290 chez Ci-VCPO, conduit à des différences de protonation entre les deux enzymes, pouvant expliquer les changements de spécificité envers les halogénures et de sensibilité au pH entre VCPO et VBPO [Weyand *et al.*, 1999].

Figure I.21 – Formation d'une région positive (δ^+) par les résidus Phe397 et Trp350 chez Ci-VCPO.



Dans l'article d'Hasan *et al.* [2006], ces hypothèses ont été reprises et étayées par des études d'enzymologie sur les VBPO. La présence d'une histidine au lieu d'une phénylalanine et dans certains cas d'une arginine à la place du tryptophane ne favoriserait pas la liaison d'un halogénure trop électronégatif, tel que le chlorure, chez les VBPO (**Figure I.21**). L'histidine forme une liaison hydrogène avec la liaison peroxyo-vanadate ce qui en diminue la capacité oxydante. La différence de protonation entre les VCPO et VBPO (**Figure I.20**) expliquerait l'absence d'inhibition par l'azide des VBPO, mais aussi le fait que le pH optimal des VBPO est plus neutre (5.0 - 6.0), comparé à celui observé chez les VCPO (4.0 - 5.0).

Les analyses cinétiques du mutant His478Ala de Co-VBPO (position équivalente à Phe397^{Ci-VCPO}) ont montré une perte de l'activité VBPO de l'enzyme sans perte de l'activité VIPO [Carter *et al.*, 2002]. Les auteurs ont conclu que cette histidine supplémentaire présente

chez toutes les VBPO peut contribuer à l'équilibre complexe des charges et au réseau de liaisons hydrogènes, et modifie les propriétés du complexe peroxy-vanadate.

Ohshiro *et al.* [2004] ont montré qu'il était possible de changer la spécificité de la VBPO de *C. pilulifera* par la mutation d'un seul résidu. Les mutants Arg397Phe et Arg397Trp (position équivalente du Trp350^{Ci-VCPO}) présentent une activité chloroperoxydase significative. Les valeurs des constantes d'affinité pour le Cl⁻ de ces deux mutants sont respectivement de 780 mM et 670 mM. Ces valeurs restent cependant très supérieures à celles de Ci-VCPO ($K_m^{Cl^-} = 10$ mM à pH 6.3). De plus les constantes d'affinité pour le bromure et le peroxyde d'hydrogène ne varient pas. Une activité VCPO a aussi été trouvée pour les mutants Arg397Gly/Ala/Pro/Ser ainsi que pour l'enzyme type sauvage (WT).

Deux mutants ont aussi été produits pour la VBPO de *Gracilaria changii* (Gc-VBPO). Le mutant Arg379His présente une diminution de l'activité bromoperoxydase, tandis que le second mutant, Arg379Phe, montre une augmentation de cette activité [Baharum *et al.*, 2013]. Ce dernier mutant présente une faible activité chloroperoxydase, en accord avec les résultats précédents d'Ohshiro *et al.* [2004]. Cependant Baharum *et al.* [2013] n'excluent pas une contamination par le bromure du chlorure de potassium. Néanmoins, d'après ces deux articles le tryptophane et la phénylalanine pourraient être impliqués dans la liaison au chlorure ce qui expliquerait cette faible activité VCPO.

En conclusion, malgré de nombreuses recherches sur les VBPO et VCPO, les mécanismes contrôlant la spécificité des VBPO sont encore mal compris et ne semblent pas seulement dépendre du changement des résidus Trp et Phe chez les VCPO, en Trp ou Arg et His chez les VBPO. Il semble que les mécanismes de spécificité soient contrôlés par le potentiel rédox de l'intermédiaire réactionnel, le peroxy-vanadate. Dans ce contexte, plusieurs facteurs peuvent modifier les charges et la protonation des oxygènes du vanadate, et par conséquent la spécificité de l'enzyme, tels que la nature des acides aminés du site actif et sa structure fine, elle-même contrôlée par les résidus environnants.

4 Présentation du projet de thèse

Dans le laboratoire la première iodoperoxydase à vanadium a été isolée de *L. digitata* (Ld-VIPO) et l'enzyme native a été caractérisée au niveau biochimique et moléculaire [Colin *et al.*, 2003, 2005]. Son expression hétérologue n'a pas aboutie, et aucune étude structure/fonction de cette enzyme n'a pu être entreprise, pour tester les bases de sa sélectivité pour l'iode. Jusqu'à récemment il n'existait aucune information structurale sur ce type particulier de VHPO, alors qu'elles pourraient permettre d'explorer de nouvelles hypothèses quant aux mécanismes contrôlant la spécificité pour les halogénures chez les VHPO. Dans ce contexte la découverte et l'expression hétérologue d'une iodoperoxydase à vanadium chez la bactérie marine *Z. galactanivorans* a ouvert une nouvelle voie de recherche dans le laboratoire, pour comprendre les liens entre structure et spécificité chez les VHPO.

4.1 Etat de l'art sur Zg-VIPO1

La caractérisation structurale de cette première iodoperoxydase à vanadium a été menée durant la thèse d'Etienne Rebuffet sous la direction de Mirjam Czejzk dans l'unité [Rebuffet, 2010]. Ce travail a permis le dépôt d'un brevet en 2011 [Delage *et al.*, 2013], et fait l'objet d'un article en cours de soumission [Delage, Rebuffet *et al.*, Annexe XXX], dont les principaux résultats sont présentés ci-après.

L'analyse de la séquence protéique du gène *zobellia_1262* indique que les acides aminés impliqués dans l'activité catalytique des VHPO et dans la liaison du vanadate sont présents chez cette enzyme (

Figure 22). Un peptide signal d'adressage extracellulaire de la protéine est prédit par SIGNALP v4.1 et LipoP v1.0. La protéine recombinante a été exprimée dans la souche BL21 d'*E. coli* sans le peptide signal d'adressage avec une étiquette 6 histidines en N-terminal et a été purifiée par chromatographie d'affinité (protocole cf. **Annexe 1**).

Figure 22 – Alignement multiple partiel des séquences en amino-acides des VHPO isolées de *Z. galactanivorans*, de *C. inaequalis* (1VCN), d'*A. nodosum* (1QI9) et de *C. pillulifera* (1UP8).

Ci-VCPO	332	ARLFALVDVACTDAGIFSWKEKWEF-EFWRPLS-----
Zg-VIPO1	303	LFAYTKASVAMADAFISCDQKYRS-NLIRPET-----
Zg-VIPO2	301	AETMSMLGVALADAFISCDQKYRS-SLIRPET-----
Cp-VBPO1	379	AHVLISLVEVATRALKAVRYCKFNHRRRLPEATGGGISVNKIAPQK-GESIFPEVDLAVEEELGDILLEKA
An-VBPO1	321	SHYFRLIGA-AELAQRSSWYCKVQVHRFARPEALGGTLHLTIKGE-----LNADFDLSLLENAEELKRV
Ld-VIPO1	383	SHLMRLVG-TAELAQKSAWYCKWNVHMFVPEAFGGSIHNVLLGK-----LDVEIAPSLLKNTDLLDRV
Consensus aa:		s+hh.hhs..t.pt...tW.pK@ph.phhPbt.....
Ci-VCPO	364	-GVRDDGRPDHGD-----PFWLTLAGPATNTNDIPPKPFEPAYPSGHATFGGAVFMVRRYVNGR
Zg-VIPO1	335	-VINQHI-----DDSWKPV-----LQTPFPPEYTSGHSVVSGAASVVLTEVFGDN
Zg-VIPO2	333	-YINNYI-----DQDWEPI-----LQTPAPPEHTSGHSVASSAAATVLTGVFGDD
Cp-VBPO1	448	EISNRKQNIADGDDPDPD-----SFLLPMAFA-----EGSPFPPEYTSGHAVVAGACVTILKAFDSDG
An-VBPO1	384	AAINAAQNPNNEV-----TYLLPQAIQ-----EGSPTFPSYFSGHATQNGAFATVTKALIGLD
LdVVIPO1	446	AARNGEINGRPGV--LDR-----TYLLSQALP-----EGSPTFPSYFAGHATQNGAFATVTKALVGLG
Consensus aa:		...p...psps.....s@h..bh.s.....b.sPsPtYsSGht.h.sGAhhphL+.hhs.p
Ci-VCPO	423	VGTWKDDEPDNIAIDMMISEELNGVNRDLRQPYDPTAPIEDQPGIVR-----TRIVRHFDSA
Zg-VIPO1	379	FSFDD-----DTEVPYG-----LPIRSFKSF
Zg-VIPO2	377	YAFVD-----ATEVPYG-----LPPRSFQSF
Cp-VBPO1	506	IEI-----DQVFEVDKDEDKLVKSSFK-----GTLTVAGEL
An-VBPO1	437	RGGD-----CYPDPVYPDDGLKLIIDFRG-----SCLTFEGEI
Ld-VIPO1	502	RGSV-----CFNDFVFPDDEGLTLLPYTG-----DDGNNCLTFEGEI
Consensus aa:		h.....s.....ss-.h...@.....shphbsph
Ci-VCPO	480	WELMFENAISSIFLGVWRFDAARAARDILIPTTTKDQVYAVDNNG-----ATVFQ--N
Zg-VIPO1	400	KQAADEAAIISRMYGGLIYRAAIEVGVKQGRDLGTFVNNLHMLSDDKKV-----AQN----
Zg-VIPO2	398	WQAAEEAAIISRLYGGIHYRPAIELGVKQGRAVGRVLVLERLRKEH-----
Cp-VBPO1	537	NKLADNIAIGRNMAGVHYFSDQFESLLLGEQVAIGILEEQSLTYGENF-----FFNLPKFD
An-VBPO1	470	NKLAVNVAFGROMLGIHYRFDGIQGLLGETITVRTLHQELMTFAEES-----TFEFLRFT
Ld-VIPO1	539	NKLAVNVALGNMLGVHWRIDSELGLLGETAAVRILQQEAVAYPEN-----GYEFLRMS
Consensus aa:		.cht.phthtR.h.GLE@p.D...tbbhGcp.h..hhppb...hsp.....sh.h...s

Les activités chloro-, bromo- et iodoperoxydase de la Zg-VIPO1 recombinante ont été révélées par un test o-dianisidine en gel natif, montrant une spécificité pour l'oxydation de l'iode (**Figure I.23**). Tout comme les autres VHPO, Zg-VIPO1 présente une thermostabilité relativement importante ($T_m = 40^\circ\text{C}$). L'activité enzymatique de Zg-VIPO1, en fonction de la concentration en iodures, suit une courbe typique de Michaelis-Menten. Les paramètres cinétiques de Zg-VIPO1 ont été déterminés en utilisant le test spectrophotométrique fondé sur le bleu de thymol suivant le protocole présenté par Verhaeghe *et al.* [2008a] et sont regroupés dans le **Tableau I.7**.

Figure I.23 - Analyse de la spécificité de Zg-VIPO1 par un test *o*-dianisidine en gel natif. C- : contrôle avec eau MilliQ ; 1 : 1 μ L d'enzyme purifiée ; 2 : 5 μ L d'enzyme purifiée et 3 : 10 μ L d'enzyme purifiée. Le gel natif, après migration, est trempé dans un tampon phosphate pH 7,4 en présence de 0,1 mM d'*o*-dianisidine, 0,45 mM d' H_2O_2 et 10 mM de KI, KBr, ou KCl.

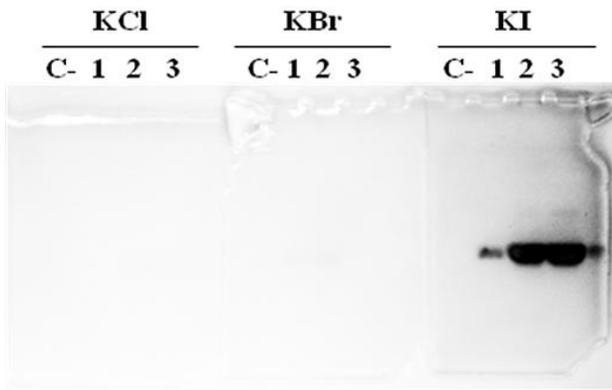


Tableau I.7 - Paramètres cinétiques de Zg-VIPO1 déterminés par un test enzymatique basé sur le bleu de thymol à pH 7,2 et Température de fusion (T_m) déterminée par analyse DLS.

Enzyme	Paramètre cinétiques			Analyse DLS
	$K_M^{I^-}$ (mM)	$k_{cat}^{I^-}$ (s^{-1})	$k_{cat}^{I^-}/K_M^{I^-}$ ($s^{-1}.mM^{-1}$)	T_m ($^{\circ}C$)
Zg-VIPO1	0.22 ± 0.01	1.98 ± 0.05	9.14	42

La structure tridimensionnelle de Zg-VIPO1 a été obtenue avec une protéine marquée à l'aide de sélénométhionine. La VIPO de *Z. galactanivorans* est un monomère de forme cylindrique d'une dimension approximative de 50 x 85 Å et est composée à 50% d'hélices (14 hélices alpha et 2 hélices 3_{10}). Deux brins beta forment un feuillet antiparallèle présent à la surface de la protéine (**Figure I.24**).

La structure globale de Zg-VIPO1 est proche de celle de Ci-VCPO avec une déviation standard de 1,79 Å. Dans le modèle structural de Zg-VIPO1, deux boucles (de Phe173 à Asp178 et de Val266 à Thr275) ne sont pas visibles dans la carte de densité électronique (2Fo-Fc) et pourraient être très flexibles. La seconde boucle visible partiellement obstrue l'entrée du tunnel du site actif (**Figure I.25-A**), tandis que chez Ci-VCPO la boucle analogue (de Tyr288 à Pro300) ne bouche par l'accès au vanadate du site actif (**Figure I.25-B**).

Figure I.24 - Structure tridimensionnelle de Zg-VIPO1. Le vanadate présent dans le site actif et l'iodotyrosine présente en surface de la protéine sont représentés en bâtonnet.

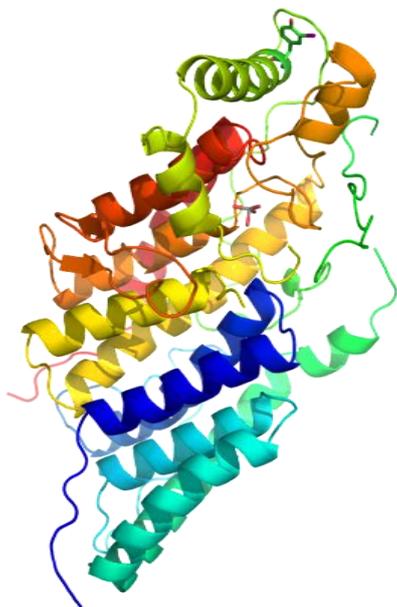
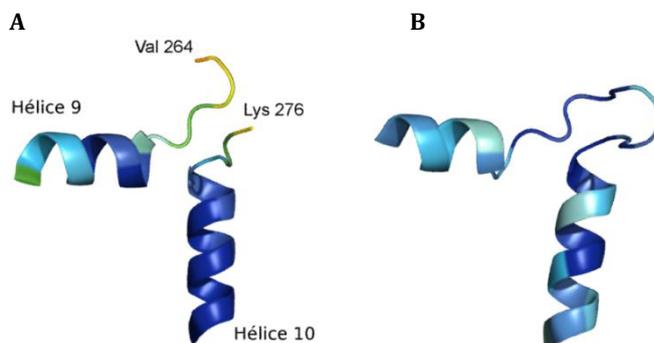


Figure I.25 - Obstruction de la cavité du site actif par une boucle chez Zg-VIPO1 (A). Cette boucle n'est pas visible chez Ci-VCPO (B). La boucle de Val266 à Thr275 de Zg-VIPO1 est colorée en grise ainsi que la boucle équivalente chez Ci-VCPO de Tyr288 à Pro300. Les protéines sont représentées en ruban et le vanadate présent dans le site actif en bâtonnet. Seule la surface des cavités est représentée en fil de fer.



Le domaine central de Zg-VIPO1 est composé par deux paquets de cinq hélices alpha (de l'hélice 1 à 5 et 10 à 16) tout comme chez Ci-VCPO (**Figure I.26**). La topologie du second paquet de 5 hélices alpha qui contient le site actif de Zg-VIPO1 et celui de Ci-VCPO est aussi conservé chez les VBPO d'algues comme par exemple chez An-VBPO1 (**Figure I.26-C**). Chose intéressante, le seul feuillet beta antiparallèle présent chez Zg-VIPO1 et inséré entre les hélices 13 et 15, est aussi conservé chez les autres VHPO. Enfin, le site actif de Zg-VIPO1 montre une conservation complète en acides aminés avec celui de Ci-VCPO (**Figure I.27**). Ces analyses structurales montrent que Zg-VIPO1 est très proche structurellement de Ci-VCPO malgré une spécificité très différentes envers les halogénures pour ces deux enzymes.

Figure I.26 - Comparaison des structures secondaires des VHPO. (A) VIPO1 de *Z. galactanivorans*, (B) VCPO de *C. inaequalis* et (C) VBPO1 d'*A. nodosum*. Les hélices conservées sont représentées en bleu. Les premiers paquets chez Zg-VIPO1 et Ci-VCPO sont représentés en vert. [Rebuffet, 2010]

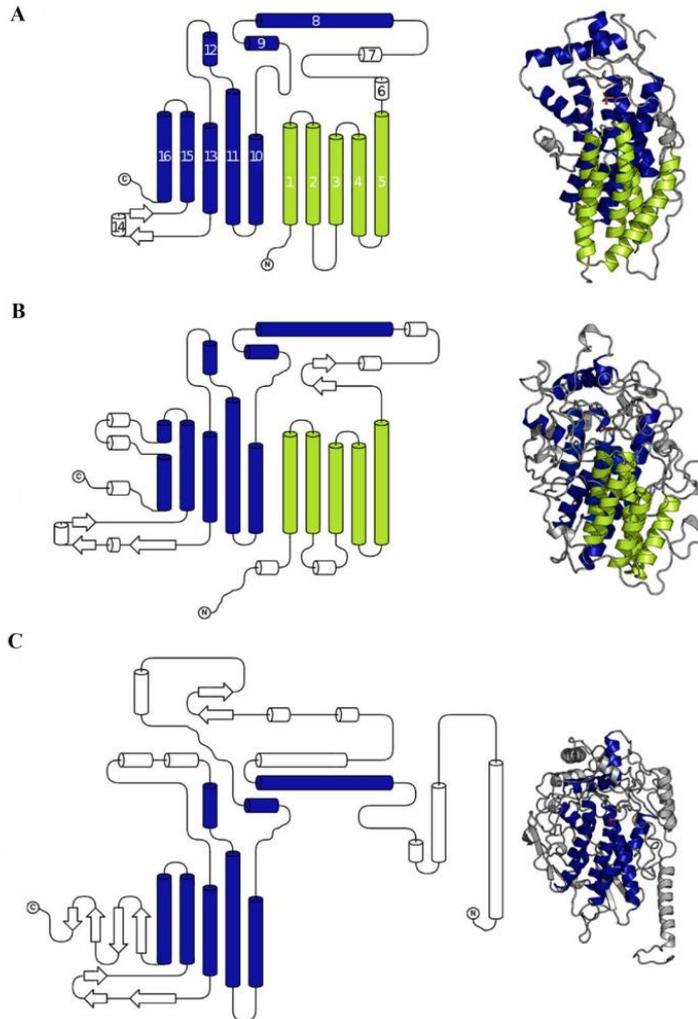
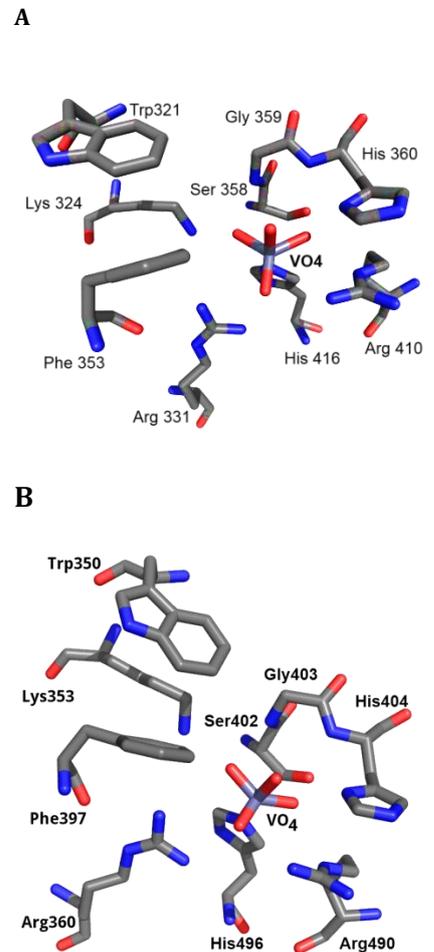


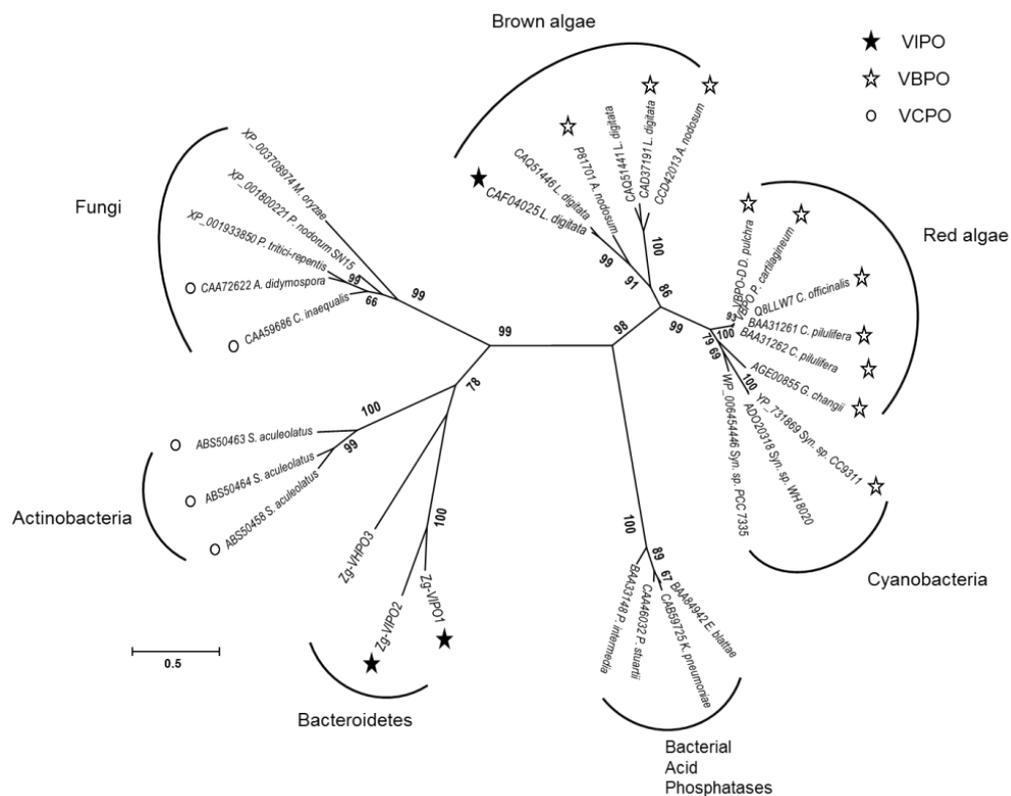
Figure I.27 - Structure du site actif de Zg-VIPO1 (A) et Ci-VCPO (B).



Une analyse phylogénétique comparant les séquences en acides aminés autour du site actif de 26 VHPO a été menée (**Figure 28**). Les résultats dévoilent un premier groupe formé par des VHPO bactériennes et fongiques incluant Zg-VIPO1 et Ci-VCPO. Ce groupe monophylétique, fortement supporté par les tests statistiques du *bootstrap*, contient aussi les deux autres VHPO annotées sur le génome de *Z. galactanivorans* et est subdivisé en deux sous-groupes comprenant d'un côté les VHPO de champignons et de l'autre celles de bactéries. Le second groupe bien défini rassemble les VHPO d'algues et de cyanobactéries et est lui-même subdivisé en deux sous-groupes ; un premier comprenant les VHPO d'algues brunes et un second réunissant les VHPO de cyanobactéries et d'algues rouges. Si l'ensemble

des VHPO semblent avoir évolué à partir d'un ancêtre commun, des activités spécifiques de l'oxydation de l'iode ont émergé deux fois, de façon indépendante, chez *Z. galactanivorans* et chez *L. digitata* et semblent donc issues d'une évolution convergente. En outre, la structure du site actif de Ld-VIPO présente de forte similarité avec celui d'An-VBPO1 à la différence qu'une sérine est remplacée par une alanine, et est donc très éloigné de celui de Zg-VIPO1. Les bases enzymatiques de la spécificité chez Ld-VIPO et Zg-VIPO1 semblent bien distinctes mais conduisent dans les deux cas à empêcher l'oxydation du chlorure et du bromure, sans doute via la diminution du potentiel rédox du peroxy-vanadate.

Figure 28 - Analyse phylogénétique de VHPO. L'arbre a été construit suivant la méthode du maximum de vraisemblance à partir d'un alignement multiple de 26 VHPO eucaryotes et procaryotes et de quatre acide phosphatases comme groupe extérieur.



4.2 Problématiques

Ce travail de thèse s'inscrit dans le contexte global de l'étude du métabolisme de l'iode et de son rôle chez les organismes vivants, et de la caractérisation des mécanismes enzymatiques associés à l'halogénéation. Durant cette thèse, deux organismes modèles ont été utilisés, la flavobactérie marine *Z. galactanivorans* et la macroalgue *L. digitata*. Chez cette

algue brune, le rôle et le métabolisme de l'iode sont déjà étudiés depuis plusieurs années dans le laboratoire tandis que *Z. galactanivorans* est une bactérie surtout étudiée pour ses capacités à dégrader les polysaccharides d'algues. De plus, la caractérisation biochimique et structurale récente de Zg-VIPO1 a permis l'accès à un nouvel outil pour comprendre les mécanismes contrôlant la spécificité pour l'iodure chez Zg-VIPO1 qui semble contradictoire avec l'hypothèse présentée par Hasan *et al.* [2006].

Des résultats préliminaires ont montré que *Z. galactanivorans* est capable de concentrer l'iode. Il a aussi été montré que certains composés organiques iodés, ayant un rôle d'antibiotique, ne perturbaient pas la croissance de cette bactérie qui semble capable de détoxifier les composés halogénés. Son génome comporte trois gènes codant pour de potentielles haloperoxydases à vanadium ainsi que deux autres gènes codant pour une déhalogénase haloacide et une iodotyrosine déiodinase (*zg-4305*). Un second volet de mon travail a consisté à caractériser ces enzymes, potentiellement impliquées dans le métabolisme de l'iode chez *Z. galactanivorans*. Pour ce faire, je me suis attaché à caractériser biochimiquement et structurellement une seconde haloperoxydase à vanadium et l'iodotyrosine déiodinase. Pour cette étude, les enzymes ont été exprimées de façon hétérologue et leurs activités enzymatiques caractérisées. En parallèle des études de cristallogénèse ont été mises en place afin d'obtenir les structures tridimensionnelles de ces enzymes. Les résultats de cette étude seront présentés dans le **chapitre 3**.

Enfin le troisième volet, qui a constitué la majeure partie de mon travail de thèse, s'est attaché à mieux comprendre les mécanismes moléculaires contrôlant la spécificité des haloperoxydases à vanadium, en utilisant comme modèle original d'étude la VIPO de *Z. galactanivorans*. Zg-VIPO1 possédant un site actif identique à celui de la VCPO de *C. inaequalis*. Le changement de sélectivité entre les deux enzymes n'est donc pas simplement contrôlé par la substitution d'un résidu par un autre, mais provient d'un mécanisme plus complexe et encore inconnu. Le rôle de la boucle présente à l'entrée du site actif n'est pour l'instant pas compris. Pour progresser sur ces questions, une approche structure/fonction par mutagenèse dirigée a été entreprise par la création d'enzymes mutantes en ciblant des acides aminés du site actif et autour de celui-ci. L'activité et la spécificité des enzymes mutées ont été caractérisées biochimiquement. En parallèle, la structure de ces protéines a été étudiée à plusieurs échelles moléculaires, soit de façon globale par une approche classique de

cristallographie, soit par XAS pour déterminer les structures fines autour du vanadate. Les résultats de ce travail seront présentés dans le **chapitre 4**.

Au cours de ma thèse et dans le cadre des projets MARIODE et KELPS, soutenus par les programmes de recherche nationaux TOXNUC-3 et NEEDS, j'ai participé à des études d'imagerie chimique de l'iode en collaboration avec des chimistes du CEA de Saclay, de l'Institut Curie, et du CNRS de Gradignan, visant à étudier la distribution et la spéciation de l'iode chez *L. digitata* et à décrypter son environnement chimique dans l'apoplasme. En parallèle j'ai développé des approches similaires chez *Z. galactanivorans*, car aucune donnée n'existait sur la localisation ou la spéciation de l'iode chez cette bactérie marine. Cette étude et ses résultats seront développés dans le **chapitre 5**.

1 Clonages de Zg-VIPO2 et Zg-IYD

Les gènes *zg-vipo2* (*zg-2088*) et *zg-iyd* (*zg-4305*) ont été clonés à partir du génome de *Z. galactanivorans* dans le plasmide d'expression pFO4 durant une phase du projet de clonage à moyen débit MARINE-EXPRESS [Graisillier *et al.*, 2010]. Ce plasmide est dérivé de pET15b (Novagen, USA) et contient un gène de résistance à l'ampicilline. L'insertion d'un gène en phase ajoute une étiquette de six histidines en N-terminal de la protéine d'intérêt. La transcription du gène est sous contrôle du promoteur T7. Les plasmides sont ensuite transformés dans la souche d'expression BL21 (DE3) d'*E. coli*.

2 Mutagenèse dirigée

Les différents mutants de Zg-VIPO1 sont obtenus par mutagenèse dirigée à l'aide du kit QuickChange Lightning Site-directed Mutagenesis (Stratagene, France), directement dans le vecteur d'expression pFO4. Ceci est réalisé en utilisant des couples d'amorces définis dans le Tableau 1. Après amplification par l'ADN polymérase (QuickChange Lightning Enzyme, dérivée de la Pfu ADN polymérase), l'enzyme *DpnI* digère le plasmide parental méthylé. Les bactéries XL1-Blue (Stratagene) sont transformées avec les plasmides pFO4-zgvipo1 possédant les mutations introduites par PCR. Après une culture de nuit à 37°C sur boîte de Pétrie contenant du milieu LB et agar contenant 100 µg/mL d'ampicilline. Les clones sont repiqués dans du milieu LB en présence d'ampicilline (100 µg/mL), des mini-préparations des plasmides pFO4-zgvipo1 sont réalisées avec le kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega Corp., USA).

Tableau II.1 – Tableau récapitulatif des primers utilisés pour les mutagenèses dirigées de Zg-VIPO1 dans le plasmide pFO4

Mutatic	Nom de l'amor	Séquence de l'amorce
Mutations de la boucle		
Y236A	Y236A-For	5' CTTTTGGGATTGTAACCTGCTGTATCGGTTACCCGTGG 3'
	Y236A-Rev	5' CCACGGTAACCGATACAGCAGGGTTACAATCCCAAAAG 3'
Y236S	Y236S-For	5' GGGATTGTAACCTTCTGTATCGGTTACCCG 3'
	Y236S-Rev	5' CGGTAACCGATACAGAAGGGTTACAATCCC 3'
Y236F	Y236F-For	5' CTTTTGGGATTGTAACCTTTTGTATCGGTTACCCGTGGC 3'
	Y236F-Rev	5' GCCACGGTAACCGATACAAAAGGGTTACAATCCCAAAAG 3'
Mutations du site actif		
W321R	W321R-For	5' GATGCCTTTATCAGTTGTCCGGACGAAAAGTACAGAAG 3'
	W321R-Rev	5' CTTCTGTACTTTTCGTCGCCGACAAGTATAAAGGCATC 3'
R236A	R326A-For	5' GGGACGAAAAGTACGCAAGCAACCTCATCCG 3'
	R326A-Rev	5' CGGATGAGGTTGCTTGCCTACTTTTCGTC 3'
F353H	F353H-For	5' CTACAAACCCCTCCGCATCCAGAGTACACCAGC 3'
	F353H-Rev	5' GCTGGTGTACTCTGGATGCGGAGGGTTTGTAG 3'
S358A	S358A-For	5' CGTTTCCAGAGTACACCCCGGACATAGTGTAGTC 3'
	S358A-Rev	5' GACTACACTATGTCCGGCGGTGTACTCTGGAAACG 3'
H360A	H360A-For	5' GAGTACACCAGCGGAGCTAGTGTAGTCTCAGGG 3'
	H360A-Rev	5' CCCTGAGACTACACTAGTCCGCTGGTGTACTC 3'
H360S	H360S-For	5' GAGTACACCAGCGGATCTAGTGTAGTCTCAG 3'
	H360S-Rev	5' CTGAGACTACACTAGATCCGCTGGTGTACTC 3'
R410A	R410A-For	5' CGAAGCAGCGATCAGTGCCATGTACGGAGGCATAC 3'
	R410A-Rev	5' GTATGCCTCCGTACATGGCACTGATCGCTGCTTCG 3'
H416A	H416A-For	5' CATGTACGGAGGCATAGCCTACCGTGCAGCTATTG 3'
	H416A-Rev	5' CAATAGCTGCACGGTAGGCTATGCCTCCGTACATG 3'
Mutation autour du site actif		
C320A	C320A-For	5' GGATGCCTTTATCAGTGCCTGGGACGAAAAGTACAG 3'
	C320A-Rev	5' CTGTACTTTTCGTCGCCGACTGATAAAGGCATCC 3'
C320S	C320S-For	5' GATGCCTTTATCAGTTCTTGGGACGAAAAGTAC 3'
	C320S-Rev	5' GTAATTTTCGTCCCAAGAACTGATAAAGGCATC 3'
D322A	D322A-For	5' CTTTATCAGTTGTTGGGCCGAAAAGTACAGAAGC 3'
	D322A-Rev	5' GCTTCTGTACTTTTCGGCCCAACAAGTATAAAG 3'
D322K	D322K-For	5' GATGCCTTTATCAGTTGTTGGAAAGAAAAGTACAGAAGCAACCTC 3'
	D322K-Rev	5' GAGGTTGCTTCTGTACTTTTCTTTCCAACTGATAAAGGCATC 3'
D322Y	D322Y-For	5' GATGCCTTTATCAGTTGTTGGTATGAAAAGTACAGAAGCAACCTC 3'
	D322Y-Rev	5' GAGGTTGCTTCTGTACTTTTCCAACTGATAAAGGCATC 3'
E355A	E355A-For	5' CAAACCCCTCCGTTTCCAGCGTACACCAGCGGACATAG 3'
	E355A-Rev	5' CTATGTCCGCTGGTGTACGCTGAAAACGGAGGGGTTT 3'

Les mutations et l'intégrité des régions codantes des Zg-VIPO1 mutantes sont vérifiées par séquençage de l'ADN double-brin dans les deux sens de lecture, selon le protocole développé à la plateforme de séquençage de la Station Biologique de Roscoff. Des réactions d'amplification par PCR ont été conduites sur les plasmides recombinants en utilisant des nucléotides marqués par différents fluorophores (kit BigDye® Terminator V3.1 (BDT), Applied Biosystems, USA). Les mélanges réactionnels (5 µL) étaient composés de 0,5 µL de BDT, 0,75 µL de tampon (400 mM Tris-HCl pH 9, 10 mM MgCl₂), 2 µL de plasmides (30 ng.µl⁻¹), 1µl d'amorce sens ou anti-sens (5 µM, pFO4_fw: 5' GCAGCAGCCACCATCACCATCACC 3', pFO4_rv: 5' CCTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGG 3') et 0,75 µl d'eau *nuclease-free*. Le programme de PCR a consisté en une dénaturation initiale à 96°C pendant 5 min suivie de 50 cycles de 30 sec à 96°C, 30 sec à 55°C et 4 min à 60°C. Les fragments ont ensuite été purifiés par 30min d'agitation à température ambiante avec le 10 µL de solution de

BigDye® X-terminator™ et 45 µL de solution SAM (kit BigDye® X-terminator™, Applied Biosystem). Puis les fragments sont séparés par électrophorèse capillaire de 50 cm en conditions dénaturantes sur séquenceur 16 capillaires ABI Prism 3130XL (Applied Biosystem). Les électrophorégrammes obtenus ont été analysés avec le logiciel BioEdit V7.0.5 afin de vérifier la présence de la mutation et l'absence d'erreurs dans la région codante.

3 Expression hétérologue des protéines recombinantes

Des précultures de 2 mL des cellules *E. coli* BL21(DE3) recombinantes ont été incubées une nuit à 37°C et sous-agitation (180 rpm), en milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg.mL⁻¹). 200 mL de milieu auto-inductible ZYP avec ampicilline [Studier, 2005] ont étéensemencés avec 200 µL de préculture et incubés pendant 3 jours à 20°C, sous agitation. Les cellules ont été centrifugées pendant 20 min à 3 000 g et 4°C, et les culots ont été stockés à -80°C.

4 Purification des protéines recombinantes de *Z. galactanivorans* (Zg-VIPO1, Zg-VIPO2, mutants de Zg-VIPO1 et Zg-IYD)

Pour la purification de Zg-VIPO1 et des mutants de cette enzyme, les culots bactériens sont suspendus dans 10 mL de tampon de lyse (Tris HCl pH 8,8 50 mM, NaCl 100 mM) pour un culot correspondant à 500 mL de culture, puis incubés sous agitation à 4°C pendant 1h avec 1 mg de lysozyme de poulet (Sigma Aldrich, USA) et 15 µL de DNaseI de pancréas de bœuf (Sigma Aldrich). Les bactéries sont lysées mécaniquement grâce à une presse de French. Les échantillons sont enfin centrifugés pendant 40 minutes à 46 000 g et 4 °C et filtrés sur un filtre cellulose acétate de 20 µm, pour éliminer les débris bactériens.

Pour la première étape de purification de Zg-VIPO1 et de ses mutants, une colonne d'affinité Hisprep FF 16/10 (Ge Healthcare, USA) est préalablement équilibrée dans le tampon A (Tris HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 100 mM, Imidazole 50 mM) et chargée avec du nickel. Les échantillons sont injectés sur la colonne, puis les protéines sont éluées avec un gradient linéaire entre le Tampon A et le Tampon B (Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 100 mM, imidazole 0,5 M) en 80 mL à un débit de 1 mL.min⁻¹ et collectées en fractions de 1,5 mL. Chaque fraction présentant une absorbance à 280nm significative est complétée avec 0,5 µL de Na₃VO₄ (0,5 M). Les fractions révélant la présence de la

protéine recombinante suite à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) sont rassemblées. Du fait du grand nombre de purifications à faire, il a été décidé de limiter la purification à une étape et par conséquent, de ne sélectionner que les fractions pures en sortie de colonne d'affinité. Les échantillons rassemblés sont ensuite concentrés à 4°C à l'aide du système Amicon Ultra-15 centrifugal Filters (Mercks Millipore), d'une taille d'exclusion de 10 000 Da, ce qui permet de réduire les volumes à 2 mL. Pour cela, plusieurs centrifugations de 4 min à une vitesse de 3 600 g sont réalisées jusqu'à concentration de toutes les fractions d'intérêt. Une homogénéisation des fractions à concentrer est nécessaire entre chaque centrifugation pour éviter la formation d'un gradient de concentration et la précipitation des protéines. L'échantillon concentré est ensuite dialysé dans 2 L de tampon final (Tris HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 50 mM) pendant 24h à 4 °C et en utilisant une membrane possédant des pores de 6000 à 8000 Da. Une ultracentrifugation à 20 000 g et 4 °C est réalisée après la dialyse pour éliminer d'éventuelles protéines précipitées. La concentration de l'échantillon est mesurée à 280 nm à l'aide du Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA). La pureté est enfin contrôlée de nouveau par SDS-PAGE et sa dispersité par diffusion dynamique de la lumière (DLS, cf partie 7).

Les purifications de Zg-VIPO2 et Zg-IYD suivent le même protocole que Zg-VIPO1 et ses mutants, décrit ci-dessus. Par contre les tampons A, B et le tampon final de concentration des protéines purifiées contiennent 200mM de NaCl, au lieu de 100 et 50 mM.

5 Analyse par gel filtration

La taille et l'état de complexation de Zg-IYD sont déterminés par gel filtration en utilisant la colonne Superdex 200 (GE Healthcare) équilibrée préalablement dans le tampon Tris HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 200 mM. L'échantillon de 0,5 mL à une concentration de 1 mg.mL⁻¹ est injecté à un débit de 0,5 mL.min⁻¹. La colonne utilisée a été calibrée à l'aide du kit Molecular Weight Markers pour gel filtration (Sigma Aldrich) afin de pouvoir déterminer la taille des protéines éluées (**Figure II.29**) :

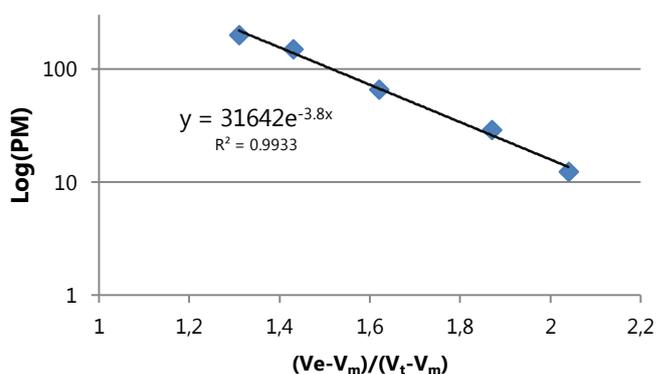


Figure II.29 - Courbe de calibration de la colonne Superdex 200, réalisée à l'aide du système AKTA Avant (GE Healthcare). En ordonnée : le poids moléculaire des protéines de référence (échelle logarithmique).

6 Analyse du cofacteur de Zg-IYD

L'identification du composé à l'origine de la coloration jaune a été menée sur la plateforme de spectrométrie de masse MétaboMer de la Station Biologique de Roscoff. La fraction protéique est précipitée par incubation 10min à 80°C puis centrifugée 20 minutes à 14 000 g. La fraction soluble est analysée par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS). Les protéines restantes sont séparées une première fois par chromatographie liquide à ultra haute pression ou UHPLC (U3000, Thermo Scientific Dionex) sur colonne Acclaim RSLC 120 C18 1,9 μm (2,1 x 100 mm, Thermo Scientific Dionex). En sortie colonne, les molécules sont analysées par spectrométrie de masse en mode négatif (LTQ-Orbitrap, Thermo Scientific). L'ion FMN $[\text{M-H}]^-$ a été caractérisé par comparaison avec une solution standard de FMN à 5 mM, en prenant en compte le temps de rétention, la masse de l'ion, ainsi que son spectre de masse.

7 Analyses par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Afin de déterminer l'homogénéité des échantillons avant d'autres analyses, l'échantillon protéique (concentration $> 1 \text{ mg.mL}^{-1}$) est centrifugé 1h à 13 000 g, à 4°C, puis 100 μL sont analysés par DLS dans une cuve en quartz, sur un appareil ZetaSizer Nano-S (Malverne Instruments, Royaume-Unis) possédant un laser vert (532 nm) comme source. La diffusion de la lumière est collectée à 173°. Cette technique permet de déterminer un profil de distribution de taille des particules en suspension et permet de déterminer la pureté des échantillons, mais aussi la température de fusion des protéines. Pour cela, les mesures ont été réalisées entre 10 et 64 °C, par

incréments de 1 °C et avec huit minutes d'équilibration par température et trois mesures à chaque température. Les données sont traitées par le programme DT v4.10 pour obtenir le rayon hydrodynamique en fonction de la température et la température de fusion (T_m).

8 Analyse des activités enzymatiques des protéines recombinantes de *Z. galactanivorans*

8.1 Analyse de l'activité enzymatique haloperoxydase

Gel o-dianisidine

L'activité haloperoxydase est détectée sur un gel de polyacrylamide en condition native en utilisant un test fondé sur l'halogénéation de l'*o*-dianisidine, dûe à la présence d'halogène oxydé et conduisant à la formation d'un composé de couleur rouge-brun. L'échantillon (60 µg de protéine) est déposé sur un gel polyacrylamide natif. Après migration, le gel est incubé, à l'obscurité pendant 15 minutes, dans une solution d'*o*-dianisidine 0,1 mM et d'halogénure 10 mM (KI, KBr ou KCl) tamponnée par du phosphate de potassium (100 mM, pH 7.4). Le gel est ensuite placé dans une solution contenant 0,45 mM de peroxyde d'hydrogène jusqu'à ce que des bandes de couleur rouge-brun correspondant à l'activité haloperoxydase apparaissent. La réaction est ensuite arrêtée en rinçant le gel dans de l'eau ultra-pure.

Criblage des spécificités haloperoxydases en plaque

Afin de cribler rapidement la spécificité des mutants de Zg-VIPO1, le test spectrophotométrique pour la détermination des activités VBPO et VIPO est basé sur les propriétés chimiques du bleu de thymol (TB) et a été décrit par Verhaeghe *et al.* [2008a]. Ici le test est utilisé en tant que criblage visuel afin d'observer l'activité VBPO ou VIPO. Le TB est un composé de couleur jaune, qui devient bleu suite à une iodation (TBI_2) ou une bromation ($TBBr_2$), pour des pH compris entre 7 et 8. Les réactions sont réalisées dans une microplaque de 96 puits avec des quantités d'enzymes égales à 10 µg pour Zg-VIPO de type sauvage (WT) et les mutants et à 2,5 µg pour An-VBPO1. Le mélange réactionnel est composé d'un tampon phosphate 100 mM (pH 7,2 pour l'activité VIPO et pH 7,8 pour l'activité VBPO), TB 0,1 mM, KI 1,5 mM ou KBr 10 mM et H_2O_2 (0,42 mM avec KI et 0,1 mM avec KBr). La réaction est démarrée par l'ajout de peroxyde d'hydrogène et est incubée durant 5 minutes à température ambiante.

Détermination des paramètres cinétiques fondée sur le test au bleu de thymol

Afin d'optimiser le temps d'analyse et les quantités de protéines utilisées, le test TB a été adapté en plaque de 96 puits à fond plat de type UV-star (Greiner bio-one, Allemagne), dans un volume final de 250 μL . Toutes les mesures ont été faites en quatre répliques à 20°C. Seize concentrations de KI, de 0,05 à 30 mM, ont été testées dans un mélange réactionnel (tampon phosphate pH 7,2 100 mM ; KI 0,05 à 30 mM ; H_2O_2 0,35 mM ; TB 0,1 mM). Les cinétiques ont été menées avec 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final de Zg-VIPO1 WT et mutants, et avec 1 μg d'An-VBPO1. L'augmentation de l'absorbance est suivie à 620 nm immédiatement après ajout de l'enzyme à l'aide du lecteur de plaque Safire² (Técan, France) et durant 5 minutes à 25°C. L'absorbance à 620 nm est convertie en millimolaire de diiodothymolsulfonephthaleine (TBI₂) suivant la formule suivante :

$$[\text{C}_{\text{TBI}_2}] = \left(\frac{A_{620}}{\epsilon * l} \right) * 2$$

Dans cette équation, $[\text{C}_{\text{TBI}_2}]$ est la concentration en TBI₂ en mM, A_{620} est l'absorbance mesurée à 620 nm, ϵ est le coefficient d'absorption molaire ($40,300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et l le trajet optique ici égal à 0,71 cm. Pour déterminer les paramètres cinétiques (K_m^{-1} et k_{cat}) de Zg-VIPO, les vitesses initiales v_i , mesurées de 0 à 112 s et pour des concentrations de KI comprises entre 0,125 et 0,5 mM, ont été exprimées en mM d'iodure convertis par minute. Les paramètres K_m^{-1} et V_{max} ont été calculés grâce à la représentation de Lineweaver-Burk. Le paramètre k_{cat} est égal à V_{max}/E_t , où E_t est la concentration finale des enzymes Zg-VIPO ($\text{PM}_{\text{Zg-VIPO1}} = 49\,404 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$; $\text{PM}_{\text{Zg-VIPO2}} = 50\,500 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

8.2 Analyse de l'activité iodotyrosine déiodinase

Afin de caractériser les substrats potentiels de Zg-IYD, différents composés halogénés commerciaux ont été sélectionnés : 3-iodo-L-tyrosine (MIT), 3,5-Diiodo-L-tyrosine (DIT), 3,5-Dibromo-L-Tyrosine (DBrT) et 3,5-Dichloro-L-Tyrosine (DCIT). Le protocole mis en place pour analyser l'activité déiodinase de cette enzyme s'inspire de ceux établis pour différentes flavine oxydoréductases [Goswami and Rosenberg, 1979; Rosenberg and Goswami, 1979; Fieschi *et al.*, 1995; Watson *et al.*, 2009].

Caractérisation par spectrométrie de masse des produits de la réaction enzymatique de déiodination

Les analyses par LC/MS pour caractériser les produits de réactions sont réalisés sur la plateforme de spectrométrie de masse MetaboMer de la Station Biologique de Roscoff. Cette technique permet de séparer dans un premier temps les molécules par chromatographie liquide, dans notre cas par UHPLC (*Ultra High Pressure Liquid Chromatography*, U3000, Dionex) sur colonne Acclaim RSLC 120 C18 1.9 μm (2.1 x 100mm ; Dionex). En sortie de colonne, toutes les molécules sont analysées par spectrométrie de masse (LTQ-Orbitrap, Thermo), laquelle mesure les rapports masse sur charge (m/z) pour chacune d'elles. Des tests préliminaires sur la tyrosine, DIT, MIT et DBrT ont permis de mettre en place le protocole d'analyse des produits de réactions. Les premiers tests enzymatiques ont été faits avec comme substrat le DIT, le MIT ou le DBrT (10 mM) en présence de NADH ou NADPH (10 mM) et comme cofacteur le FAD (1 mM) dans un tampon Tris HCl pH 7.5 50 mM, NaCl 100 mM.

Test spectrophotométrique

Le test a été adapté en plaque de 96 puits à fond plat de type UV-star (Greiner bio-one) dans un volume final de 250 μL . Toutes les mesures ont été faites en quatre répliques à 20°C. Un spectre de 250 nm à 700 nm a été mesuré au bout de 10 minutes à l'aide du lecteur de plaque Safire² (Técan, France).

Le test est réalisé avec 1,25 μg d'enzyme, dans un tampon Tris HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 100 mM, en présence de 3,5-diiodo-L-tyrosine à 5 mM final, et le volume final de 250 μL est ajusté avec de l'eau ultrapure. Enfin, 25 μL d'une solution de dithionite de sodium 0,28 mM et de bicarbonate de sodium 0,29 mM sont rajoutés pour démarrer la réaction. Les mêmes mélanges réactionnels sont réalisés en présence de 0,3 mM NADH et 0,3 mM NADPH au lieu du dithionite de sodium.

9 Analyses structurales des protéines recombinantes

9.1 Cristallogénèse

Des conditions de cristallisation des différentes enzymes recombinantes ont été recherchées via l'utilisation d'un robot (Honeybee, Genomic Solutions) en utilisant différents cribles commerciaux (Qiagen PACT, JCSG+, PEG I et PEG II). Pour Zg-VIPO1 His360Ala (concentration : 10,57 mg/mL) la cristallisation en goutte suspendue a été obtenue en mélangeant 2 μL de protéine avec 1 μL de la solution du réservoir. Celui-ci contenait 500 μL d'une solution de d'HEPES pH 7,5

0,1M contenant du PEG 2000 30-36%, du bromure de sodium 0,2 M et du chlorure de lithium 0,15 M.

Dans le cas de la protéine Zg-VIPO1 et du mutant Phe353His, une première condition de cristallisation en goutte suspendue a consisté en 2 μ L de protéines (concentrées à 15mg/mL) et 1 μ L de solution de cristallogénèse. Le puits contient 500 μ L d'une solution de citrate de sodium pH 4,6 0,1M, PEG 3500 20-26% et acétate de lithium 0,1 M.

Pour Zg-IYD (concentrée à 8,35 mg/mL) la solution de cristallisation a consisté à mélanger 2 μ L de solution de protéine avec 1 μ L de la solution du puits, contenant 500 μ L d'une solution de tri-sodium citrate pH 5,5 0,1 M, PEG 3000 18% et glycérol 10%.

9.2 Acquisition des données de diffraction RX

Les données de diffraction des rayons X de Zg-IYD et des mutants de Zg-VIPO1 ont été collectées à l'ESRF (Grenoble, France) respectivement sur la ligne ID23-EH1 et ID14-4. Les lignes sont toutes les deux équipées d'un détecteur ADSC Q315R.

9.3 Préparations des échantillons

La technique d'absorbance des rayons X (XAS) nécessite une concentration minimale de 1 mM pour le vanadium, soit 49 mg/mL de protéines, pour un volume d'échantillon de l'ordre de 50 μ L. Les protéines sont concentrées à l'aide du système Amicon Ultra-0,5 mL centrifugal (Merck Millipore) d'une taille d'exclusion de 3 kDa à 4°C afin d'atteindre la concentration souhaitée. La concentration est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop (ThermoScientific) à 280 nm ($\epsilon_{\text{Zg-VIPO1}} = 70\,820 \text{ L. mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), après centrifugation pendant 45 minutes à 14 000 g et à 4°C. La forme peroxy-vanadate est obtenue après incubation pendant 20 minutes à 4°C, de 2 ou 4 équivalents molaires de peroxyde d'hydrogène. Enfin, 10% de glycérol sont rajoutés à l'échantillon avant remplissage des cellules porte-échantillons puis congélation dans l'azote liquide. Les concentrations des échantillons étudiés de Zg-VIPO1 WT en présence de 0, 2 ou 4 équivalents d' H_2O_2 sont respectivement de 2,38 mM (118 mg/mL), 2,26 mM (112 mg/mL) and 2,5 mM (123 mg/mL). Les échantillons des mutants His360Ala et Phe353His sont analysés à une concentration de 5,66 mM (279 mg/mL) et 4,86 mM (240 mg/mL). Le spectre XAS au seuil K du vanadium est aussi obtenu pour Na_3VO_4 (5 mM) dans du tampon Tris HCl pH 7,5 mM 50 mM et NaCl 50 mM.

9.4 Collecte des spectres d'absorbances des rayons X

Les spectres XAS au seuil K du vanadium ont été obtenus sur les lignes SAMBA du synchrotron SOLEIL et DUBBLE de l'ESRF de Grenoble. Sur la ligne SAMBA le faisceau est focalisé par cristal double Si(220). Les spectres d'absorption des rayons X sont mesurés en fluorescence avec un détecteur au germanium de 36 pixels EGPX avec un film de 124 µm de Beryllium (Canberra, Areva, France). Une feuille de titane de 21 µm est placée entre le détecteur et le cryostat refroidi par l'hélium liquide à 25 K. Les scans au seuil K du vanadium sont calibrés avec comme référence une feuille de vanadium. Une photo-réduction des échantillons est observée, par conséquent la position de l'échantillon est modifiée entre chaque acquisition. Le nombre d'acquisition pour chaque échantillon est reporté dans la **Table II.7**. Les données sont moyennées pour Na₃VO₄, Zg-VIPO1 WT sous la forme native ou peroxovanadate ainsi que pour les deux mutants His360Ala et Phe353His à l'aide du logiciel ATHENA [Ravel and Newville, 2005].

Table II.7 - Liste des échantillons analysés par absorption des rayons X durant les différentes expériences.

Ligne	Echantillon	Concentration (mM)	Type (nombre)	d'acquisition
SAMBA (SOLEIL)	Zg-VIPO1	2.4	EXAFS (7)	
	Zg-VIPO1	2.3	EXAFS (12)	
	Zg-VIPO1 + 2 Eq. H ₂ O ₂	2.5	EXAFS (10)	
	Zg-VIPO1 + 4 Eq. H ₂ O ₂	3.6	EXAFS (9)	
	Phe353His	4.9	XANES (9)	
	His360Ala	5.7	XANES (9)	
DUBBLE (ESRF)	Zg-VIPO1	6.5	EXAFS (14)	
	Tyr263Ala+ 4 Eq. H ₂ O ₂	5	EXAFS (32)	
	Tyr263Ala	4	EXAFS (10)	
	His360Ala	5.2	EXAFS (4)	
	His360Ala + 4 Eq. H ₂ O ₂	6.4	EXAFS (15)	
	Phe353His+ 4 Eq. H ₂ O ₂	4.9	EXAFS (5)	

10 Imagerie chimique et spéciation de l'iode chez *Z. galactanivorans* et *L. digitata*

10.1 Imagerie DESI-2D/TOF

Les essais ont été entrepris sur des sporophytes jeunes (2 - 8 cm) et des fragments adultes (1 -2 m) de *L. digitata*. Les algues fraîches ont été récoltées dans la baie du Bloscon à Roscoff (Bretagne, France), et conservées dans des bassins oxygénés contenant de l'eau de mer pour les

sporophytes juvéniles, et dans de l'eau de mer courante à 17°C pour les sporophytes adultes. Certains échantillons ont été congelés et conservés à -20°C, ou bien lyophilisés à froid. Des échantillons de l'algue rouge *Palmaria palmata* ont aussi été prélevés et analysés.

L'échantillon est fixé au support mobile par un ruban adhésif double face. La source est réglée à 1 mm de l'échantillon, et le capillaire d'entrée du spectromètre de masse à 2 mm. Enfin le pas de déplacement est réglé à 500 µm/sec. Le solvant pour la désorption contient du méthanol à 50% (V/V) dans de l'eau ultrapure et est injecté à un débit de 3 µL/min, pulvérisé grâce à un flux d'azote pressurisé à 7 bars. Les tensions appliquées à la buse d'électronébulisation et au capillaire sont respectivement de 50V et 3500 V. Le spectre de masse est réglé pour analyser les molécules de poids moléculaire compris entre 5 et 500 Da.

Le spectromètre de masse par temps de vol (TOF) (LCT Premier XE, Waters, Manchester, R.-U.) est équipé d'une source DESI 2D (Prosolia, Indianapolis, USA) (**Encart 4**) dont le déplacement est piloté par le logiciel Omnispray (Prosolia). Dans ce dernier cas, le solvant est délivré à l'aide d'un pousse-seringue 11plus (Harvard Apparatus, France) équipé d'une seringue de 500 µL (Hamilton, Bonaduz Suisse). Les spectres de masse, acquis par le logiciel Masslynx® v4.1 (Waters, Manchester UK), ont été combinés avec le logiciel Fire-Fly v1.3.0.1 (Prosolia) puis traités avec le logiciel Biomap (Novartis, Suisse) permettant la génération d'image 2D.

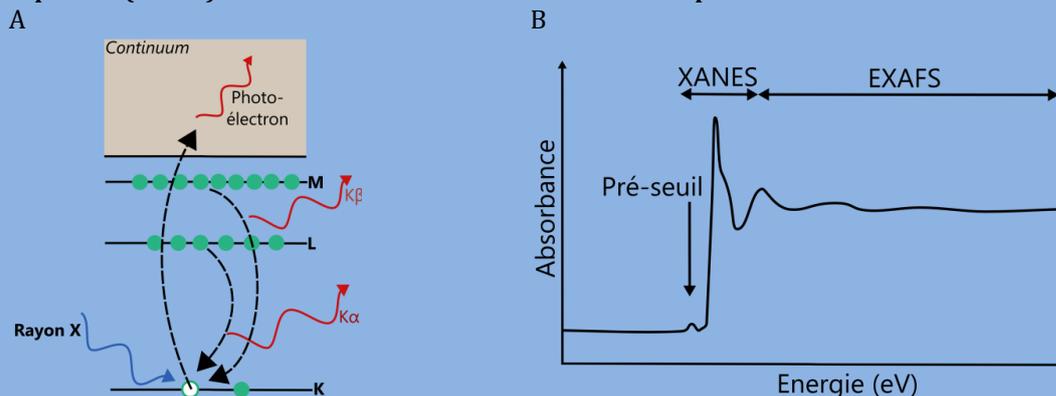
Encart 3

Principe de la technique de spectroscopie d'absorption des rayons X

La technique de spectroscopie des rayons X (XAS) permet l'étude de la structure locale (distances inter-atomiques autour de l'atome absorbeur, géométrie) et de la structure électronique (état d'oxydation, coordination). Cette technique est principalement utilisée en physique des matériaux et peut être transposée à la biologie. A la différence de la diffraction des rayons X, cette technique permet d'obtenir une structure autour d'un hétéro atome à haute définition mais à petite échelle. Le XAS est basé sur l'étude de l'interaction entre un faisceau de rayon X et un échantillon. L'absorption des rayons X peut être observée soit par transmission, soit par réflexion ou par fluorescence. Suivant le niveau d'énergie du photon, celui-ci peut être absorbé par un élément et conduit, lors de l'absorption, à l'émission d'un électron de cœur des couches K ou Ln ($1 < n < 3$). L'énergie des seuils d'absorbance est spécifique de chaque élément. Lorsque l'énergie de photon X correspond à l'énergie de transition d'un électron de cœur celui-ci passe ensuite dans le continuum (espace inter-atomique). Puis un électron des couches supérieures (L ou M) comble le trou produit par l'éjection ce qui provoque l'émission d'un photoélectron ($K\alpha$ ou $K\beta$)

Le terme général de XAS comprend plusieurs techniques suivant la gamme d'énergie étudiée. La spectroscopie de structure près du seuil d'absorbance des rayons X, ou XANES, se limite à une gamme d'énergie allant de 0 à 100 eV au-dessus du seuil d'absorbance. Le XANES renseigne sur l'état d'oxydation, la coordination et la géométrie de l'élément étudié. L'EXAFS, ou spectroscopie d'absorption des rayons X étendue à la structure fine, étudie une gamme d'énergie plus grande pouvant aller à quelques milliers d'eV au-dessus du seuil d'absorbance. Cette technique permet d'obtenir des informations sur les distances inter-atomiques. Aux énergies employées dans l'EXAFS, il est possible de faire certaines approximations importantes et de ne considérer que les perturbations des ondes émises par l'atome absorbeur par les ondes rétrodiffusées à cause des réflexions sur les atomes voisins. Ces simplifications ne sont pas valables dans le cas du XANES. A plus basse énergie les phénomènes de diffusion doivent être pris en compte. Enfin le près-seuil correspond à la transition de l'électron vers les premiers niveaux vides ou partiellement remplis.

Figure 2 - Phénomène d'interaction des rayons X avec les électrons de cœur d'un atome (A). L'analyse EXAFS et XANES diffèrent dans la gamme d'énergie utilisée (B). Lorsque l'énergie du photon X est suffisante un électron (rond vert) des couches de cœur (K ou L) est éjecté dans le continuum. Un second électron d'une couche supérieur (L ou M) comble le trou et conduit à l'émission d'un photoélectron.



10.2 Imagerie par MALDI/TOF

Des coupes de stipes de jeunes *L. digitata* (< 20 cm), préalablement incluses dans une résine OCT, sont réalisées à l'aide d'un cryomicrotome, à une épaisseur de 20 µm, et déposées sur des lames de verre recouvertes d'indium-tinnoxide (Bruker Daltonics GmbH) et laissées séchées à l'air. Un sporophyte juvénile est directement déposé sur une lame de verre compatible avec le MALDI.

Le spectromètre de masse utilisé est de type temps de vol (AutoFlex Speed, Bruker Daltonik GmbH, Allemagne) équipé d'un laser Smart Beam (1 kHz) absorbant dans l'UV à une longueur d'onde de 356 nm. Le pas de déplacement du laser est défini en fonction de la résolution souhaitée, de la taille des régions analysées et varie de 25 à 100 µm. Les mouvements du porte échantillon sont pilotés par le logiciel FlexControl® et les spectres de masse sont exploités par les logiciels FlexAnalysis® et Fleximaging® (Bruker Daltonics GmbH).

Encart 4

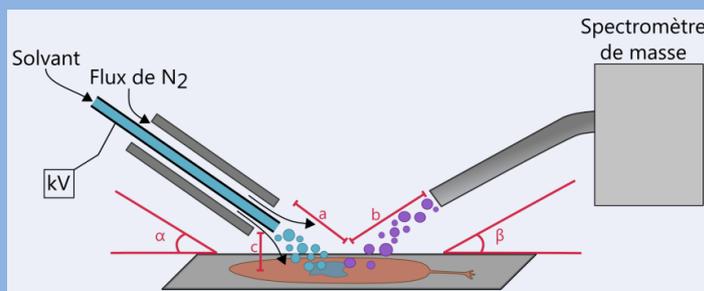
Principe de la technique de désorption-ionisation par électronébulisation

La technique de désorption-ionisation par électronébulisation ou DESI consiste à analyser par spectrométrie de masse les molécules présentes en surface d'un échantillon. Elle permet l'analyse d'échantillons complexes sans préparation préalable, ainsi que l'obtention d'images 2D de la distribution de molécules. Enfin, le DESI-2D/TOF permet aussi l'étude de la spéciation de l'élément, dans certaines limites, du fait de l'absence de préparation de l'échantillon. La résolution spatiale est de l'ordre du millimètre. Le DESI consiste à impacter la surface d'un échantillon avec les gouttelettes chargées de solvant. Le solvant est pulvérisé par une buse d'électro-nébulisation et est propulsé par flux d'azote à une pression de quelques bars. Dans un premier temps, le solvant va solubiliser les molécules de la surface analysée puis le flux provoque la formation de gouttelettes secondaires contenant les composés présents dans la surface dissoute. Durant leurs temps de vol jusqu'au spectromètre de masse, les gouttelettes secondaires diminuent en taille à cause de l'évaporation du solvant provoquant l'explosion coulombienne, due à la densité de charge importante en surface (limite de Rayleigh). Les ions sont transportés à pression atmosphérique jusqu'au spectromètre de masse. L'échantillon est déposé sur un platine porte-échantillon mobile, permettant l'acquisition de spectres de masse à différentes positions et donc, d'établir distribution des éléments à la surface de l'échantillon.

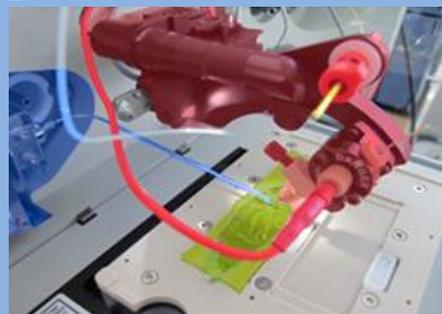
Les paramètres géométriques (angles et distances) entre la buse d'électro-nébulisation, le capillaire de transfert et l'échantillon sont des éléments critiques dans l'obtention de spectres de masse de qualité. De la même façon, la tension de la buse et du capillaire, ainsi que la pression du flux d'azote jouent des rôles importants dans les réglages. Enfin le dernier paramètre important à contrôler est le choix et la composition du solvant.

Figure 2 - Principe de la source de DESI (A) et photographie du système (Prosolia) (B). Les paramètres géométriques contrôlés sont indiqués en rouge sur le schéma. La buse d'électro-nébulisation, coloré en rouge (B), propulse des gouttelettes de solvant (A- bleu) et le flux d'azote provoque la formation de gouttelettes secondaires (A- violet). Elles pénètrent ensuite dans le spectromètre de masse par un capillaire de transfert coloré en bleu (B). L'échantillon, coloré en vert (B), peut être déplacé sur une platine porte-échantillon.

A



B



10.3 Imagerie par PIXE

Les échantillons analysés sont des coupes transversales de stipes et de lames de sporophytes de *L. digitata*, adultes mesurant de 20 cm à 2 m, et de juvéniles. Des échantillons d'*Ascophyllum nodosum* ont aussi été analysés. Les algues fraîches ont été récoltées dans la baie du Bloscon à Roscoff (Bretagne, France) et envoyés à l'équipe « Interface Physique & Chimie pour le Vivant » pilotée par Richard Ortega, au Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan (CENBG), pour la préparation des échantillons. Les coupes transversales d'une épaisseur de 0,5 mm sont traitées suivant le protocole de Verhaeghe et al. [2008b], cryo-fixées dans l'isopentane refroidi par l'azote liquide, puis lyophilisées à -35°C.

Les analyses par microsonde nucléaire (**Encart 5**) ont été effectuées sur la plateforme AIFIRA (Applications interdisciplinaires des faisceaux d'ions de Région Aquitaine) du CENBG. L'énergie du faisceau utilisé était de 3,0 MeV, accéléré par accélérateur électrostatique simple étage Singletron. Les émissions PIXE et RBS sont collectées à l'aide, respectivement, de deux détecteurs contenant un cristal Si(Li), placés à 45° de part et d'autre du faisceau incident, et d'un détecteur RBS à Silicium, disposé à 135° sous le faisceau incident. Le faisceau est focalisé sur l'échantillon en un point de 1 µm.

L'analyse de la distribution et de la concentration des éléments Cl, K, Br, Fe Zn et As est basée sur les émissions de la raie K_{α} de ces derniers. Pour l'I, l'analyse est faite à partir de la raie L_{β} de cet élément. Les méthodes d'analyse et de quantification sont décrites dans l'article de Verhaeghe et al. [2008b].

Encart 5

Principe de la technique d'imagerie par microsonde nucléaire

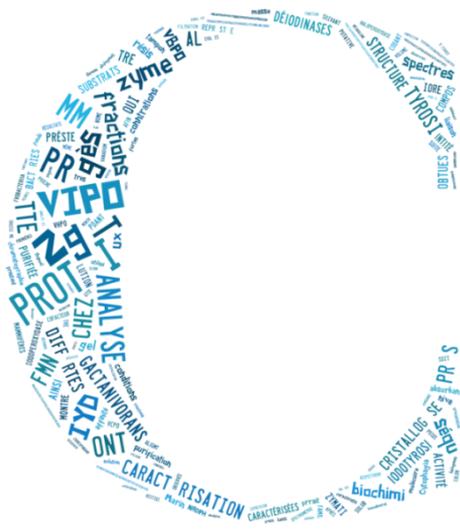
L'imagerie par microsonde nucléaire est une technique « non destructive » permettant une caractérisation élémentaire d'échantillons à l'échelle du micromètre. En biologie, cette technique est principalement utilisée pour déterminer la distribution et quantifier des éléments traces. La résolution permet obtenir des résultats en imagerie à l'échelle tissulaire ou sur cellule isolée de grande taille.

La méthode consiste à exposer un échantillon à un microfaisceau d'ions légers (He^+ ou $^n\text{H}^+$) d'une énergie de l'ordre du MeV, puis de détecter l'émission de particules ou de rayonnements propre à chaque élément composant l'échantillon. En biologie, trois techniques sont utilisées en parallèle pour détecter les particules ou les rayonnements émis.

La première technique, émission de rayons X induits par des particules chargées ou PIXE, repose sur la détection des raies X émises lors de l'éjection d'un électron des couches profondes (K ou L) d'un élément à la suite de l'excitation par le faisceau incident. Chaque raie est spécifique d'un élément et son intensité est proportionnelle à la quantité en élément. Cette technique permet d'analyser tous les éléments de masse atomique supérieur à 11 ($Z > \text{Na}$).

La seconde technique employée, la spectroscopie de rétrodiffusion de Rutherford ou RBS, consiste à mesurer l'énergie des ions incidents après rétrodiffusion sur l'échantillon. Les particules provenant du microfaisceau percutent le noyau composant l'échantillon et perdent de l'énergie lorsqu'elles sont rétrodiffusées. Cette perte d'énergie est dépendante du type d'atome que la particule rencontre. Cette technique permet d'accéder à la teneur en éléments légers et majeurs de l'échantillon (C, N, O,...) et par conséquent sa masse.

Enfin, la dernière technique employée lors d'imagerie par microsonde nucléaire est la microscopie d'ion en transmission à balayage ou STIM, et vise à mesurer la perte d'énergie des particules incidentes après avoir traversé l'échantillon. Cette technique permet de définir la densité de l'échantillon ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) et d'obtenir des images densitométriques révélant les structures tissulaires. Le STIM est couplé au RBS afin de normaliser les résultats de PIXE, permettant l'accès à une distribution quantitative d'un élément dans un tissu.



Caractérisation biochimique d'enzymes du métabolisme de l'iode chez *Z. galactanivorans* : Zg-4305, une iodotyrosine déiodinase putative et Zg-2088, une haloperoxydase à vanadium putative.

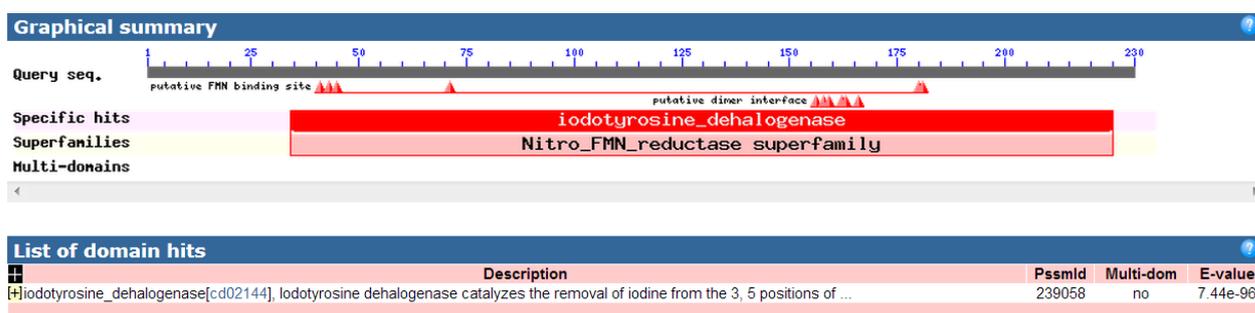
1. Caractérisation biochimique d'une iodotyrosine déiodinase chez *Z. galactanivorans*.

L'iode est un élément rare dans l'environnement terrestre. Par conséquent, les mammifères ont développé un système complexe de recyclage de l'iode dans la thyroïde impliquant des enzymes de la famille des iodotyrosine déiodinases. Ces enzymes appartiennent à la famille des nitro-réductases à FMN. Elles, comportent un site de liaison de la FMN et forment des homodimères. Au cours de l'annotation du génome de *Z. galactanivorans* [Barbeyron et al., en préparation], le gène *zg-4305* a été identifié comme codant pour une iodotyrosine-déiodinase (IYD) putative. Dans le cadre de mon travail de thèse, ce gène est donc un candidat intéressant pour l'étude d'enzymes du métabolisme de l'iode chez *Z. galactanivorans*. Dans ce chapitre, les caractérisations moléculaires et biochimiques de la protéine Zg-4305 seront présentées.

1.1 Analyse in silico de la protéine Zg-4305

La recherche de domaines conservés dans la séquence protéique codée par le gène *zg-4305* (Zg-4305, 230 acides aminés) prédit la présence d'un domaine caractéristique des iodotyrosine déiodinases antérieurement dénommées iodotyrosine déhalogénases (**Figure III.30**). L'analyse bioinformatique du gène *zg-4305* montre l'absence de peptide signal qui permettrait son adressage à la membrane ou sa sécrétion dans le périplasma.

Figure III.30 - Résultat de l'analyse de la séquence protéique de Zg-4305 sur le serveur CDD (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)



L'analyse par Blast contre la banque de protéines « nr » révèle que des protéines sont potentiellement présentes chez plusieurs bactéries appartenant à différentes classes de Bacteroidetes (Flavobacteriia, Sphingobacteriia et Cytophagia). Ceux-ci présentent de forts taux

d'identité avec Zg-4305, mais la fonction de ces protéines reste encore inconnue (**Table III.8**). Malgré cette grande variété, toutes ces bactéries ont été isolées dans des milieux marins ou aquatiques hormis *Spirosoma spitsbergense* qui a été isolée dans le permafrost en Arctique [Finster *et al.*, 2009].

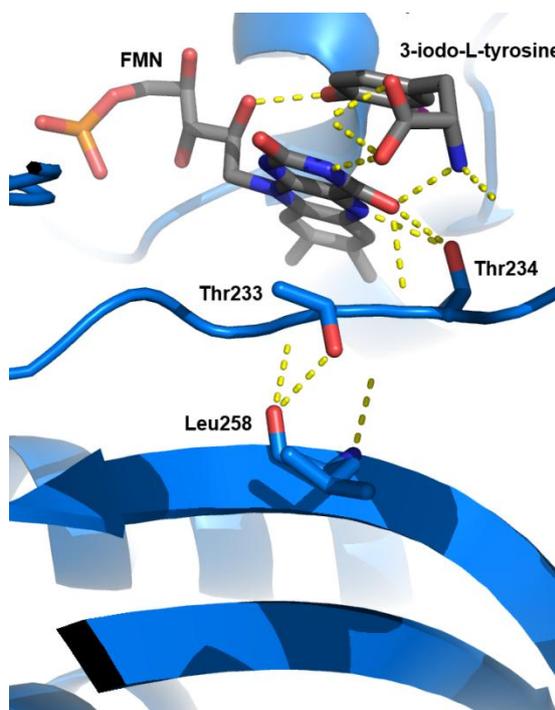
Table III.8 - Résultat de l'analyse par Blast (NCBI) de la protéine Zg-4305. Seules les séquences bactériennes présentes dans la banque de séquence de protéines non-redondantes (nr) et présentant plus de 60% d'identité avec Zg-4305 sont présentées.

Espèce	Classe	Couverture (%)	Valeur E	Identité (%)	Environnement
<i>Maribacter</i> sp. HTCC2170	Flavobacteriia	100	1 ^e -126	73	Marin
<i>Aquimarina agarilytica</i>	Flavobacteriia	99	3 ^e -115	69	Marin
<i>Lewinella cohaerens</i>	Sphingobacteriia	97	4 ^e -112	69	Côte océanique
<i>Gramella forsetii</i>	Flavobacteriia	96	2 ^e -107	66	Marin
<i>Flavobacterium</i> sp. ACAM123	Flavobacteriia	96	9 ^e -101	62	Marin
<i>Marivirga tractuosa</i> DSM4126	Cytophagia	96	3 ^e -100	63	Marin
<i>Flavobacterium frigidis</i>	Flavobacteriia	99	2 ^e -96	60	Lac d'Antarctique
<i>Fulvivirga imtechensis</i>	Cytophagia	96	4 ^e -96	61	Marin
<i>Algoriphagus</i> sp. PR1	Cytophagia	94	3 ^e -94	61	Marin
<i>Owenweeksia hongkongensis</i> DSM17368	Flavobacteriia	93	5 ^e -94	66	Marin
<i>Microscilla marina</i>	Cytophagia	93	3 ^e -86	62	Marin
<i>Lewinella persica</i>	Cytophagia	90	1 ^e -88	60	Marin
<i>Fibrisoma limi</i>	Cytophagia	90	2 ^e -88	60	Boue côtière
<i>Spirosoma spitsbergense</i>	Cytophagia	88	6 ^e -88	61	Permafrost
<i>Halicomenobacter hydrosis</i> DSM1100	Cytophagia	85	3 ^e -87	61	Eau douce

La séquence codante de *zg-4305* montre des pourcentages d'identité élevés avec les iodotyrosine déiodinases humaines (49% d'identité) et celle de la souris *Mus musculus* (48% d'identités). Elle présente aussi des pourcentages d'identité importants avec des IYD putatives identifiées dans les génomes de *Xenopus tropicalis* (Xt-Q5M8L2) et de *Danaus plexippus* (Dp-G6CZZ4) [Hellsten *et al.*, 2010; Zhan *et al.*, 2011]. Chez *Xenopus laevis* de nombreux articles ont montré le rôle d'hormones thyroïdiennes et de la IYD dans le développement de cet organisme [Simon *et al.*, 2002; Fujimoto *et al.*, 2012], mais aucun article ne fait référence au rôle de l'iode ou de métabolites iodés chez *D. plexippus* ou plus largement chez les papillons.

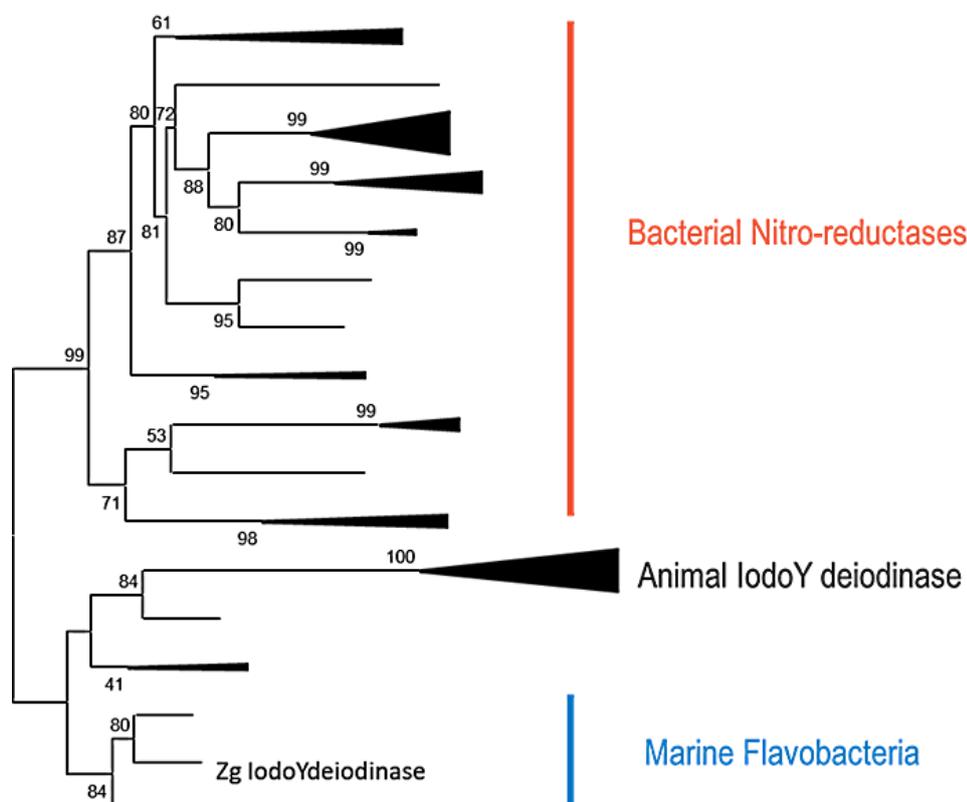
L'alignement de la protéine Zg-4305 avec ces différentes IYD animales est présenté dans la **Figure III.31**. L'analyse montre l'absence de la région membranaire chez Zg-4305. Toutefois cette région permet l'ancrage de cette enzyme dans Mm-IYD et Hs-IYD [Friedman *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2009]. Les résidus décrits comme liants le substrat et la FMN dans la structure établie pour la région cytoplasmique de l'IYD de souris [Thomas *et al.*, 2009] sont fortement conservés chez Zg-4305. Seules une valine et une thréonine sont, respectivement, remplacées par une leucine et une histidine chez Zg-4305 au niveau d'un des motifs contribuant à cette liaison de la FMN. La

Figure III.32 - Thréonine 233 impliquée dans la liaison de la FMN. La FMN et la 3-iodo-L-tyrosine (MIT) sont représentées en bâtonnet. Les carbones sont colorés en gris. Les thréonines 233 et 234 et la leucine 258 (numéro de la structure de Mm-IYD, code PDB : 3GFD) sont représentées en bâtonnet et les carbones sont représentés en bleu. Les liaisons hydrogènes et les interactions polaires sont représentées en lignes pointillées jaunes.



L'analyse phylogénétique a été menée en construisant un arbre suivant le maximum de vraisemblance, fondé sur 147 positions informatives de 62 séquences protéiques alignées par le programme MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) (**Figure III.33**). La protéine Zg-4305 appartient à un groupe comprenant l'ensemble des IYD de mammifères, qui est bien séparé des nitro-réductases bactériennes, avec un embranchement fortement soutenu par une valeur de *bootstrap* de 99%. Ce groupe peut être divisé en deux sous-groupes, avec d'un côté les IYD animales et de l'autre des IYD putatives annotées dans le génome de flavobactéries marines. Jusqu'à présent, aucune enzyme du second sous-groupe n'a été caractérisée, tant au niveau biochimique qu'au niveau structural. Dans le sous-groupe contenant les IYD de mammifères, seules les enzymes Hs-IYD et Mm-IYD ont été caractérisées au niveau biochimique. La structure tridimensionnelle a été obtenue pour la région cytoplasmique de Mm-IYD (code d'accèsion PDB : 3GFD) [Thomas *et al.*, 2009].

Figure III.33 – Analyse phylogénétique simplifiée des iodotyrosines déiodinases. Arbre construit suivant le maximum de vraisemblance à partir d'un alignement de 62 protéines et de 147 positions



Zg-4305 semble donc très proche au niveau phylogénétique des IYD de mammifères. L'analyse *in silico* a montré une forte identité entre ces enzymes et la conservation des résidus impliqués dans la liaison avec le cofacteur FMN ou le substrat 3-iodo-L-tyrosine (MIT). L'analyse de la structure de Mm-IYD a montré que les substitutions de deux résidus pourraient ne pas perturber la liaison de la FMN. L'ensemble de ces résultats renforce l'annotation initiale de la protéine Zg-4305, qui correspondrait à une iodotyrosine déiodinase.

Certains génomes de bactéries isolées de milieux aquatiques, possèdent protéines aux fonctions inconnues, mais présentant de fortes identités avec la protéine Zg-4305 ($\geq 60\%$). Il est intéressant de noter que, dans la plupart de ces bactéries, des gènes homologues aux iodoperoxydases à vanadium de *Z. galactanivorans* ont également été identifiés (cf. **partie 4.1**). La protéine Zg-4305 peut, sans doute, avoir un rôle associé à ces VHPO et en particulier dans la déiodation de composés halogénés. Enfin la présence de ces protéines uniquement chez les animaux et chez les Bacteroidetes semble indiquer un transfert latéral de gènes entre ces deux *phyla* au cours de l'évolution.

1.2 Caractérisation biochimique de la protéine recombinante Zg-4305

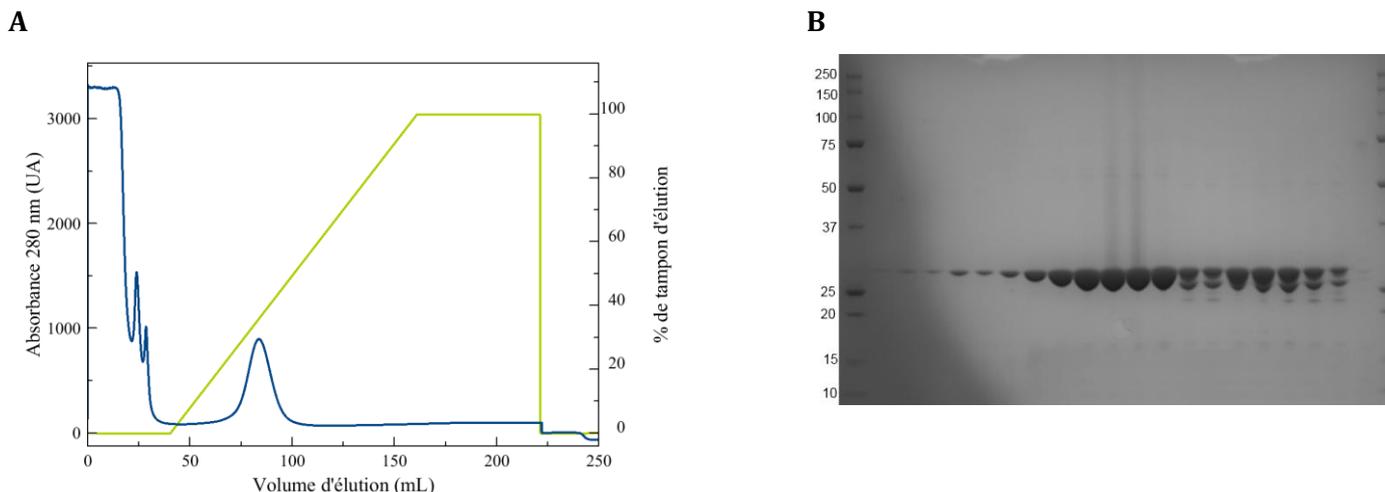
1.2.1 Purification de la protéine recombinante Zg-4305

Durant une phase du projet de clonage à moyen débit MARINE-EXPRESS [Groisillier *et al.*, 2010], le gène *zg-4305* a été cloné dans le plasmide pFO4, un tag de six histidines a été ajouté en N-terminal. L'expression hétérologue de ces protéines recombinantes est réalisée dans la souche BL21(DE3) d'*E. coli*. Les premiers tests de purification ont utilisé le même protocole que pour la protéine recombinante Zg-VIPO2.

La protéine a été purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (**Figure III.34-A**). Les fractions éluées ont été analysées sur un gel dénaturant (**Figure III.34-B**). Certaines fractions obtenues sont relativement pures, dès la fin de la première étape de purification. Afin d'éviter une seconde étape de purification par gel filtration, les fractions les plus pures, situées au début du pic, sont regroupées et concentrées, puis dialysées, afin d'éliminer l'imidazole, inhibiteur de la cristallogénèse qui pourrait aussi perturber l'activité enzymatique.

Bien que de nombreuses fractions n'aient pas été retenues, la quantité finale de la protéine Zg-4305 purifiée (18,2 mg pour 500 mL de culture bactérienne) est suffisante pour poursuivre des analyses biochimiques et structurales. Si par la suite, il est nécessaire d'améliorer le rendement, il sera possible d'optimiser la purification en ajoutant une étape de gel filtration à la suite de la chromatographie d'affinité afin d'éliminer les protéines contaminantes et utiliser ainsi un plus grand nombre de fractions.

Figure III.34- Purification de Zg-4305. (A) Profil d'élution de la protéine Zg-4305 sur colonne d'affinité au nickel. (B) SDS-PAGE des fractions correspondant au pic d'élution. L'absorbance à 280 nm de l'éluât est représentée en bleu. La concentration du tampon d'élution (TrisHCl 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, Imidazole 500 mM) est représentée en vert. Les protéines sont révélées sur le gel par le bleu de Coomassie. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est Precision Plus Protein standards (kDa, BioRad)



1.2.2 Caractérisation de la structure quaternaire de Zg-4305 en solution

Les iodotyrosine déiodinases caractérisées chez les mammifères, ainsi que les enzymes de la super famille des nitro-FMN-reductases (**Figure III.30**), forment des homodimères. Afin de connaître la structure quaternaire de la protéine Zg-4305 en solution, j'ai mis en place une expérience de gel filtration. La colonne Superdex 200 a été calibrée sur l'ÅKTA. Auparavant, une courbe de calibration est établie avec le kit Molecular Weight Markers pour gel filtration (Sigma Aldrich). L'échantillon, contenant 0,1 mg/mL de protéines purifiées, est injecté (**Figure III.35**). Le poids moléculaire a été calculé suivant la formule :

$$\text{Log(PM)} = \frac{V_e - V_m}{V_t - V_m}$$

Où V_e est le volume d'élution, V_m est le volume mort et V_t est le volume total de la colonne. Le poids moléculaire (PM) déterminé expérimentalement est de 63 kDa (**Table III.9**). Cette taille semble correspondre à un homodimère de l'enzyme recombinante qui possède un PM théorique de 27,2 kDa.

Figure III.35 – Chromatogramme de gel filtration obtenue pour Zg-4305. L'absorbance à 280 nm de l'éluât est représentée en bleu.

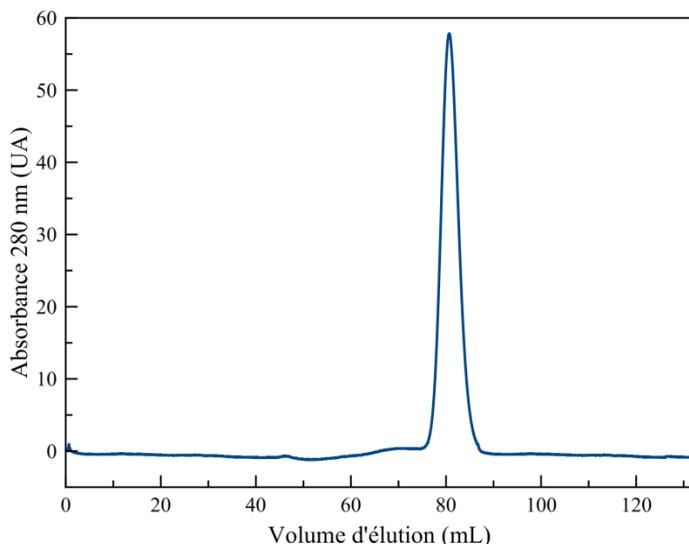


Table III.9 –Détermination du poids moléculaire de Zg-4305. Le poids moléculaire théorique a été calculé à partir de la séquence recombinante de Zg-4305 à l'aide du logiciel en ligne ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). Le poids moléculaire observé a été calculé par rapport à la courbe étalon (cf. matériels et méthodes).

Volume d'éluât (mL)	80,6
PM expérimental (kDa)	62,6
PMrecZgIYD_theo (kDa)	27,2
2*PMrecZgIYD_theo (kDa)	54,4

1.2.3 Caractérisation du co-facteur de Zg-4305

Lors de la purification par chromatographie d'affinité de Zg-4305, une coloration jaune est associée aux fractions protéiques présentant une absorbance à 280 nm. De plus, le gel dénaturant présente une bande de la taille attendue pour la protéine Zg-4305 (**Figure III.34** et **Figure III.36**). Après la dialyse des fractions purifiées dans le tampon de conservation à l'aide d'une membrane dont le seuil de coupure est de 6-8 kDa, la coloration n'a pu être supprimée.

Afin d'identifier le composé à l'origine de la coloration des échantillons, un aliquot de la protéine Zg-4305 a été précipité par chauffage (10 min à 80°C), puis la fraction protéique a été éliminée par centrifugation (20 min à 14 000 g). La coloration jaune reste, dans le surnageant. Un spectre d'absorbance a été mesuré de 230 à 800 nm sur cette fraction soluble, ainsi que sur de la FMN, de la flavine adénine dinucléotide (FAD) et de la riboflavine (**Figure III.37**). Cette fraction soluble présente un spectre proche de ceux des différentes flavines. Toutefois cette technique reste insuffisante pour caractériser le composé présent.

Figure III.36 - Fractions collectées lors de la chromatographie d'affinité. Les fractions présentant une coloration jaune sont associées aux fractions contenant Zg-4305.

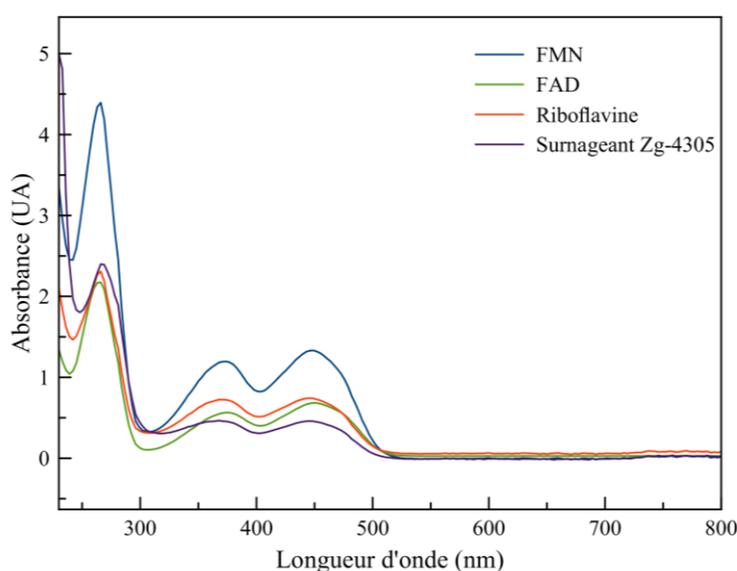


Figure III.37 - Spectre d'absorbance des FMN, FAD, Riboflavine et de la fraction soluble de Zg-4305 après précipitation.

En parallèle, la fraction soluble a donc été analysée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse sur la plateforme MétaboMer de la Station Biologique de Roscoff. Cette technique permet de séparer les molécules suivant leurs profils d'élution. Dans notre cas nous avons utilisé la chromatographie liquide à ultra haute performance. En sortie de colonne, toutes les molécules sont analysées par spectrométrie de masse (LTQ-Orbitrap, Thermo) qui mesure les rapports masse sur charge (m/z). L'analyse de cette fraction, en mode négatif, présente un pic majoritaire ($m/z = 455,0963$) (**Figure III.38**) pouvant correspondre à une molécule de formule brute $C_{17}H_{21}N_4O_9P$ ($m/z_{théo} = 455,0973$; $\Delta ppm = -2,281$). La formule brute déduite de l'analyse LC/MS pourrait correspondre à celle de la FMN (Source Chempider : <http://www.chemspider.com/Molecular-Formula/C17H21N4O9P>) (**Figure III.39**). La flavine mono

nucléotide est un cofacteur naturel des IYD ainsi que des nitro-FMN-réductases. L'enzyme recombinante Zg-4305 est donc très probablement purifiée avec une FMN provenant du métabolisme d'*E. coli*.

Figure III.38 - Spectre de masse en mode négatif de la fraction soluble de Zg-4305 après précipitation des protéines par chauffage. Spectre de masse expérimental en haut et théorique en bas.

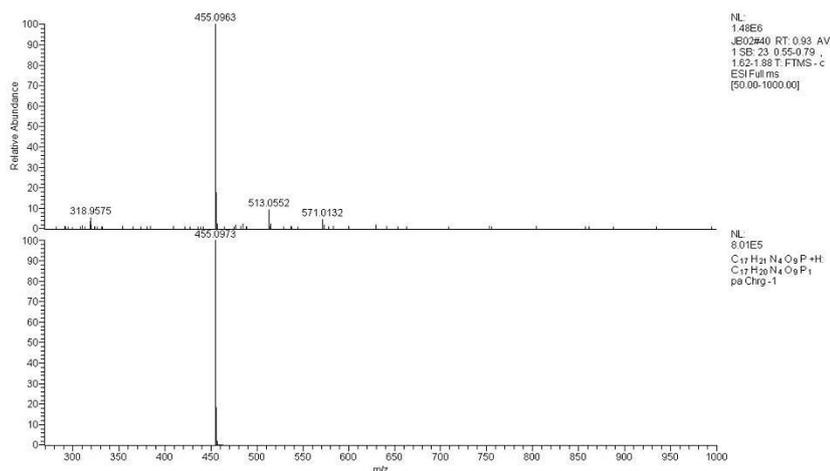
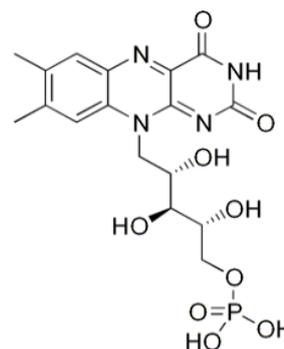
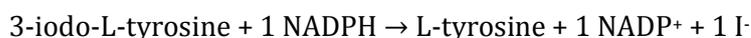


Figure III.39 - Structure chimique de la flavine mononucléotide ($m/z_{\text{théorique}}=455.0973$), candidat possible pour interpréter le pic : $m/z_{\text{mesuré}}=455.0963$.



1.2.4 Recherche d'une activité enzymatique pour la protéine Zg-4305

Les IYD sont classées dans la nomenclature EC 1.22.1.1 et catalysent la déiodation de la tyrosine suivant les réactions suivantes :



Dans la littérature, quatre protocoles différents ont été employés pour caractériser l'activité de iodotyrosine déiodinase de mammifères [Goswami and Rosenberg, 1979; Rosenberg and Goswami, 1979; Fieschi *et al.*, 1995; Watson *et al.*, 2008].

Des tests enzymatiques ont donc été entrepris afin de déterminer l'activité biochimique de la protéine Zg-4305 et d'identifier ses substrats. Les IYD déjà caractérisées, utilisent le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) et/ou le NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) comme donneur d'électrons. Elles utilisent comme cofacteur aussi bien la FAD, la FMN ainsi que la riboflavine. Le substrat naturel de Zg-4305 étant inconnu et les analyses par spectrométrie de

masse n'ayant pas permis d'identifier des métabolites halogénés produits chez *Z. galactanivorans*, nous avons décidé de cribler différents composés commerciaux halogénés, pouvant être déhalogénés par cette enzyme. Les molécules sélectionnées sont les 3-iodo-L-tyrosine (MIT) ; 3,5-Diiodo-L-tyrosine (DIT) ; 3,5-DiBromo-L-Tyrosine (DBrT) et 3,5-DiChloro-L-Tyrosine (DCIT).

1.2.4.1 Caractérisation de l'activité biochimique de Zg-4305

Les substrats potentiels sélectionnés (MIT, DIT, DBrT et DCIT) et les produits potentiels des réactions enzymatiques de déhalogénéation (Tyrosine, NAD^+ , NADP^+) ne possèdent pas les propriétés nécessaires pour suivre la réaction par spectrophotométrie du fait du recouvrement de leurs spectres. En effet, les tyrosines halogénées ou non halogénées possèdent un maximum d'absorbance à 280 nm, qui se situent au même endroit que celui des protéines (**Figure III.40-A**). De plus, les spectres d'absorbance du NADH et NADPH se situent, quant à eux, à des longueurs d'ondes identiques à celui des différentes flavines (**Figure III.40-B et -C**).

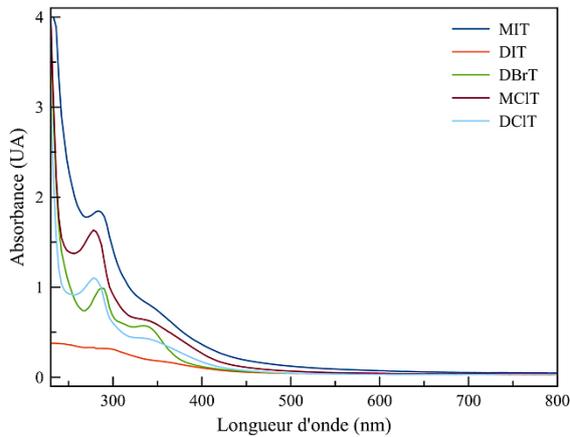
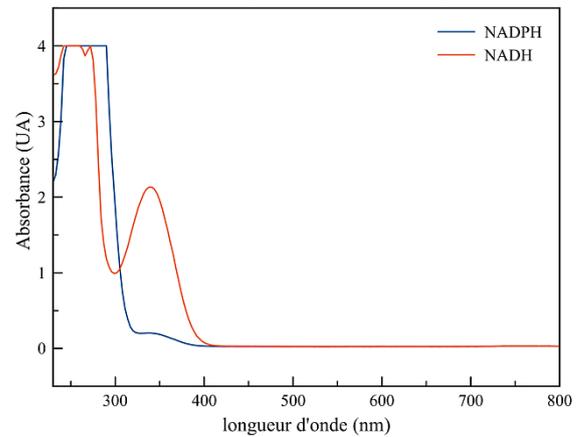
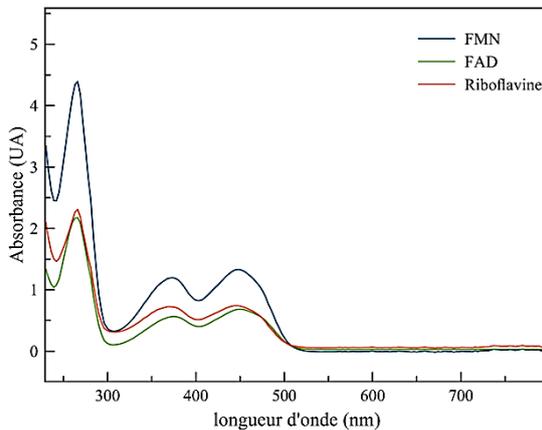
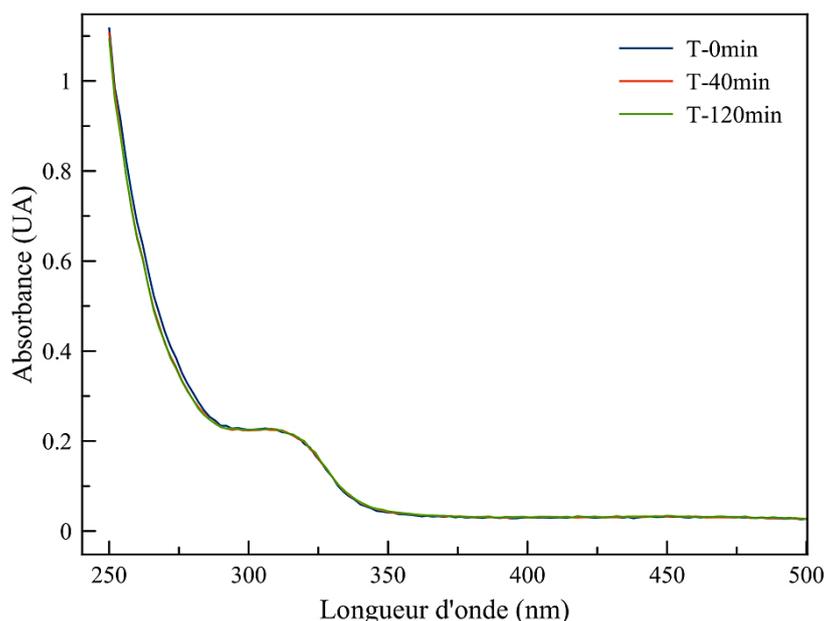
A**B****C**

Figure III.40 - Spectres d'absorbance de 230 à 800 nm des différentes tyrosines halogénées (A), nicotinamides (B) et flavines (C).

Du fait du recouvrement des spectres entre les substrats, les cofacteurs et l'enzyme, les tests préliminaires n'ont pas permis de déterminer une longueur d'onde précise pour suivre la cinétique. Nous avons décidé de faire un spectre de 250 à 500 nm, sur le mélange réactionnel et de comparer ensuite les spectres obtenus après une incubation de 40 et 120 minutes à 20°C (**Figure III.41**). Les tests ont été réalisés en présence de 1,25 µg de Zg-4305, de DIT (10 mM), et de dithionite (0,28 mM, agent plus réducteur que le NADH et le NADPH,). Les spectres ainsi obtenus ne présentent pas de changement significatif. L'enzyme, malgré la présence de dithionite, ne présente donc pas d'activité déiodinase sur la diiodityrosine.

Figure III.41 - Spectre d'absorbance de Zg-4305 en présence de DIT et dithionite après incubation de 40 et 120 minutes à 20°C.

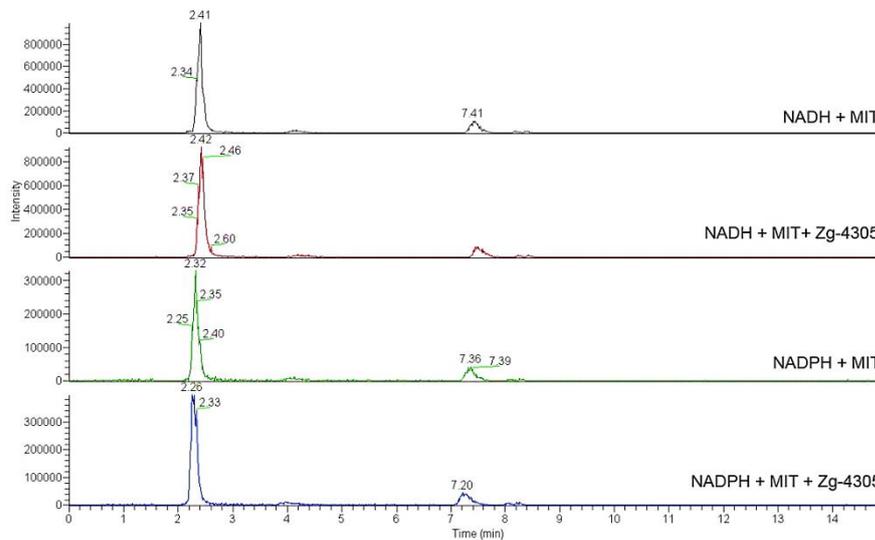


1.2.4.2 Analyse des produits de réaction enzymatique par spectrométrie de masse

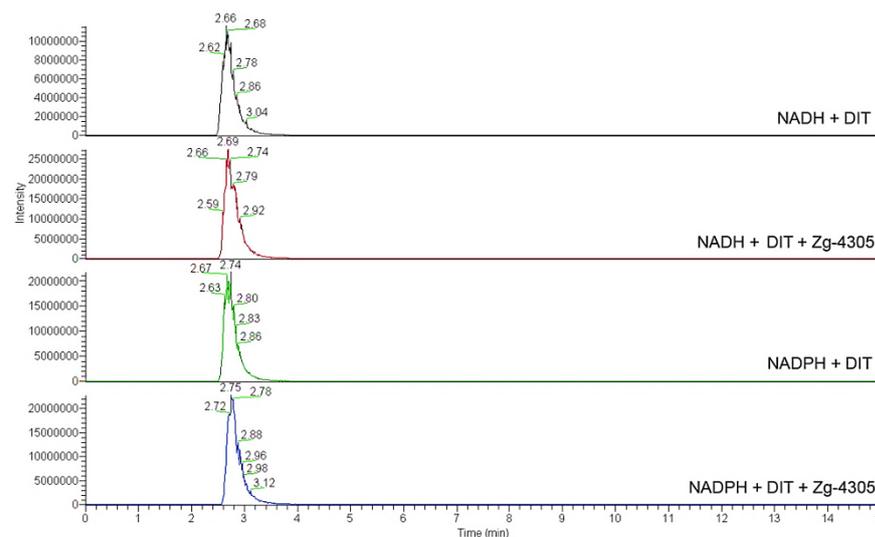
Au vu des limites posées par les spectres d'absorbance des différents composés, nous avons décidé d'étudier la déiodation des L-tyrosines par spectrométrie de masse. Ne connaissant pas la vitesse de réaction, nous avons décidé d'incuber 2h la protéine Zg-4305 en présence de DIT ou de MIT (10 mM), en présence de NADH ou NADPH (10 mM) et en utilisant la FAD (1 mM) comme cofacteur. Après précipitation des protéines par incubation à 80°C, la fraction soluble est analysée par LC/MS. L'analyse des spectres de masses ainsi obtenus pour les fractions solubles ne montrent aucune modification entre les contrôles sans protéine et les tests réalisés en présence de Zg-4305. Les chromatogrammes en mode positif des ions de m/z 182,0812, 337,9778 et 433,8744, correspondent respectivement à la L-tyrosine, la MIT et la DIT, extraites en présence de NADH ou NADPH (**Figure III.42**). Aucune variation des profils des chromatogrammes n'a été observée que ce soit en présence ou non de la protéine Zg-4305, avec comme substrat la MIT (**Figure III.42-A**) ou en présence de NADH ou de NADPH. Un second substrat, la DIT, a aussi a été testé par cette technique. Comme précédemment, aucune modification des chromatogrammes n'a été observée en présence ou non d'enzyme (**Figure III.42-B**). L'analyse des différents spectres obtenus montre l'absence d'un ion dont le m/z de 182,0812 est caractéristique du $[M-H]^+$ de la tyrosine ($C_9H_{12}NO_3$). Ces premières analyses n'ont donc pas permis de caractériser l'activité biochimique de la protéine Zg-4305.

Figure III.42 – Chromatogrammes des ions caractéristiques de la tyrosine (m/z : 182,0812) et de la 3-monoiodo-L-tyrosine (m/z : 337,9778) (A) ou de la 3,5-diiodo-L-tyrosine (m/z : 433,8744) (B). Les spectres ont été obtenus en mode positif. En abscisse, le temps de rétention exprimé en minutes et en ordonnée, l'intensité exprimée en unité arbitraire.

A



B

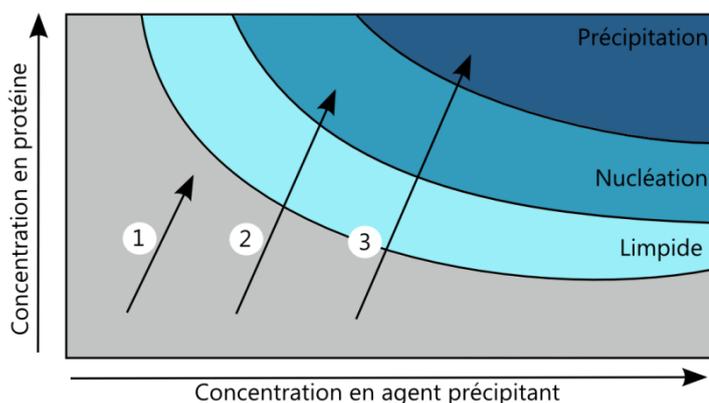


1.2.5 Cristallogénèse de Zg-4305

En parallèle à ces études enzymatiques, des tests de cristallogénèse ont été entrepris en vue de déterminer la structure tridimensionnelle de la protéine Zg-4305. Ces expériences de cristallogénèse ont été réalisées sur la plateforme de cristallographie des protéines de la Station Biologique de Roscoff. La technique de cristallogénèse employée est basée sur la diffusion de vapeur. L'évaporation d'une goutte est contrôlée dans un puits scellé, contenant en haut une goutte de protéine (~1-2 μ L) diluée dans un tampon de cristallogénèse. Les variations des différents

volumes présents dans le puits et du ratio entre solution de protéine et tampon de cristallogénèse permettent de contrôler la cristallogénèse de la protéine à l'intérieur de la goutte. D'autres facteurs (température, composition du tampon de cristallogénèse) sont également importants pour contrôler le phénomène d'évaporation de la goutte. La diminution du volume de la goutte conduit à une augmentation de la concentration en protéine. C'est au cours de ce processus que des événements de nucléation de cristaux peuvent se produire (**Figure III.43**). Le choix de la composition du tampon de cristallogénèse est important car il est possible que celui-ci ne permette pas la formation de cristaux mais conduise soit à la précipitation de la protéine soit à aucun changement de phase.

Figure III.43 - Diagramme de phase présentant les conditions nécessaires à la cristallisation d'une protéine par diffusion de vapeur. Suivant les conditions de cristallogénèse, la protéine peut rester soluble (1) quand la protéine reste dans des conditions de sous-saturation. Lorsque la protéine passe dans des conditions de sursaturation, elle peut soit former un cristal (2), soit précipiter (3).



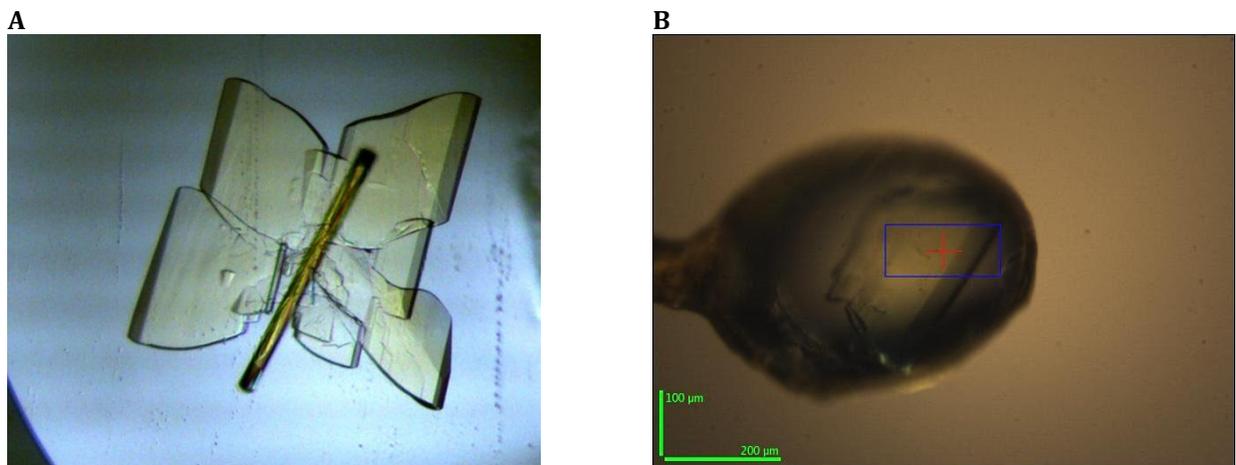
Les conditions de cristallisation dépendent de chaque protéine. Il est nécessaire de trouver pour chacune d'entre elles, les conditions originales permettant leur cristallogénèse. Les criblages commerciaux PEGI, PEGII, PACT et JCSG+ (QIAGEN) ont donc été utilisés afin de tester, en parallèle, de nombreuses conditions, en utilisant des plaques 96 puits remplies par le robot HoneyBee 963 (Cartesian, Genomic Solution). Les meilleures conditions ont ensuite été reproduites et optimisées manuellement en plaques de 24 puits, par la technique de la goutte suspendue. Le but de cette optimisation est d'obtenir des monocristaux suffisamment gros pour permettre des analyses par diffraction des rayons X.

Pour Zg-4305, les meilleures conditions de cristallogénèse ont été obtenues dans des coupes composées de 2µL de Zg-4305 (8,35 mg/mL) avec 1 µL de tampon de cristallogénèse. Ce dernier était composé de Tri-sodium citrate pH 5,5 0,1M, PEG 3000 18-20%, glycérol 6-10% et le réservoir en contenait 500 µL. Les cristaux sélectionnés (**Figure III.44**) ont été ensuite trempés dans une

solution de cryo-protectant composée de la solution de cristallisation et 10% de glycérol. Puis ils ont été montés en boucle et congelés sous flux d'azote.

Un jeu de données a été obtenu sur la ligne ID14-4 du synchrotron ESRF de Grenoble et reste encore à traiter. L'analyse automatique préliminaire des données, montre que le groupe d'espace est P 1 21 1 avec des paramètres de maille de taille 57,3 x 74,8 x 59,3 Å ($\alpha = 90,0$; $\beta = 113,6$; $\gamma = 90,0$) et d'une résolution de 100-2,08 Å.

Figure III.44 - Cristal de la protéine Zg-4305 obtenue dans une goutte suspendue (A) et fragment du cristal monté sur une boucle (B). Le cristal a été obtenu dans une solution de cristallogenèse contenant du tri-sodium citrate pH 5,5 0,1 M, PEG 3000 20%.



2 Caractérisation biochimique d'une seconde iodoperoxydase chez *Z. galactanivorans*.

L'annotation experte du génome de *Z. galactanivorans* a révélé la présence de trois gènes homologues aux VHPO. L'un d'eux code pour la protéine Zg-VIPO1, caractérisée biochimiquement comme étant spécifique de l'oxydation de l'iodure. Mon travail de thèse a consisté à caractériser au niveau biochimique et structural, une autre haloperoxydase à vanadium, codée par le gène *zg-2088*.

2.1 Analyse *in silico* de Zg-2088 (Zg-VIPO2)

Le gène *zg-2088* code pour une protéine de 441 résidus et la séquence protéique présente 46% d'identité avec Zg-VIPO1 codée par *zg-1262* et isolée aussi chez *Z. galactanivorans*. L'analyse des contextes génétiques des gènes codant pour Zg-VIPO1 et Zg-2088 montre des similarités. En

effet, ces deux gènes sont précédés respectivement par trois et deux gènes annotés comme codant pour des protéines de la famille ASPIC/UnbV (**Figure III.45**) et l'analyse, à l'aide de la base de données KEGG OC, montre que ces gènes pourraient être co-transcrits dans le même opéron. Les protéines de la famille ASPIC/UnbV ont été décrites comme des protéines sécrétées dans les cartilages humains [Steck *et al.*, 2007]. Elles pourraient former des protéines avec une structure à β -tonneau de sept brins, proche du motif de liaison au Ca^{2+} des intégrines α [Redruello *et al.*, 2010]. Cependant la séquence du gène *zg-2250*, codant pour la troisième haloperoxydase à vanadium potentielle, est éloignée de celles des deux premiers gènes. Ce troisième gène code pour une protéine de 484 acides aminés de long, qui ne présente que 20 % d'identités avec Zg-VIPO1, et a un environnement génomique très différent. D'après la conservation de leurs séquences protéiques et des gènes présents en amont (gènes codants pour les protéines ASPIC/UnbV-like), les gènes *zg-1262* et *zg-2088* pourraient provenir d'une duplication d'un gène ancestral. Pour le troisième gène, l'histoire évolutive est moins claire. Il pourrait provenir d'une évolution divergente de deux gènes dont l'un se serait ensuite dupliqué pour donner naissance aux gènes *zg-1262* et *zg-2088*.

Les résidus caractéristiques de la signature de la famille des haloperoxydases à vanadium sont présents dans les séquences de Zg-2088 et Zg-2250 (**Figure III.46**). L'analyse phylogénétique ainsi que l'étude de l'alignement de séquences protéiques montrent que Zg-2088 est très proche de Zg-VIPO1. De plus, comme Zg-VIPO1, l'analyse de la séquence indique que cette protéine semble posséder une boucle obstruant l'entrée du site actif (**Figure III.46**). L'analyse par SIGNALP v4.1 [Petersen *et al.*, 2011] montre que le gène ne possède pas de séquence d'adressage à la membrane ou d'excrétion.

Figure III.45 - Contexte génétique des gènes annotés codant pour des VHPO. Les gènes codants pour une VHPO sont écrits en gras et colorés en vert. Les gènes au voisinage de *zg-1262*, *zg-2088* et *zg-2250* prédits par KEGG SSDB (<http://www.kegg.jp/kegg/ssdb/>) comme formant un cluster de gènes, sont indiqués en noir. Ceux n'ayant pas été prédits comme tels, sont indiqués en rouge. Les gènes colorés en bleu semblent former un motif conservé entre les gènes *zg-1262* et *zg-2088*.

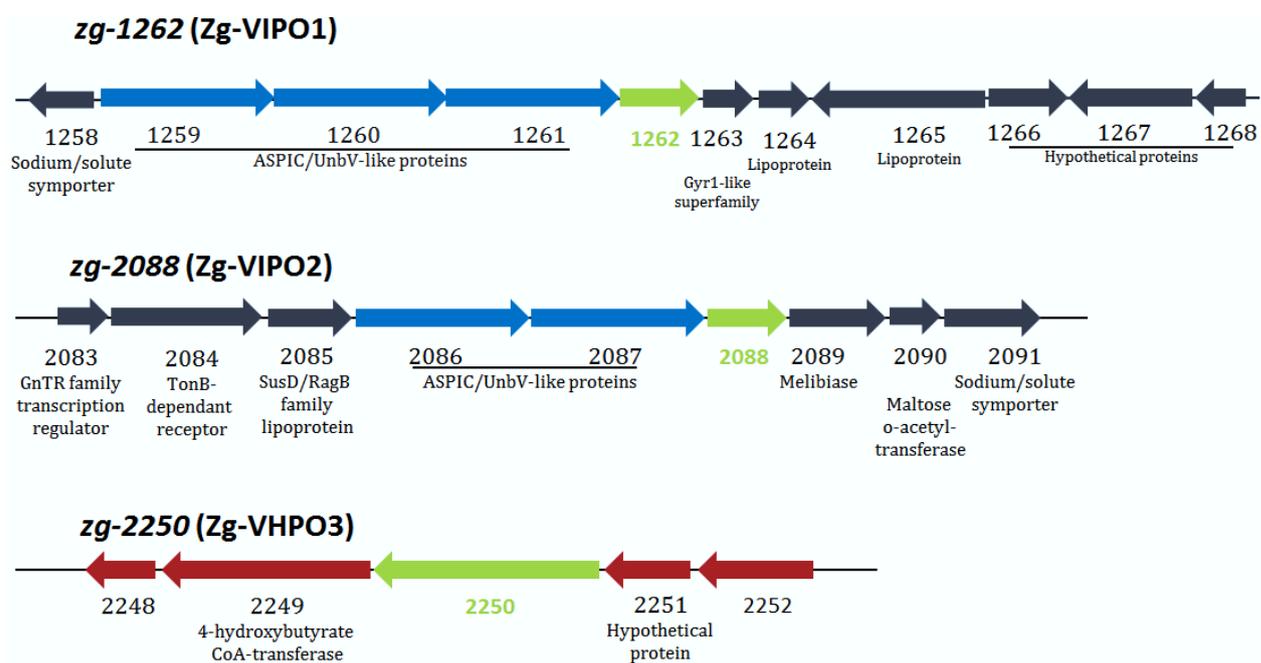
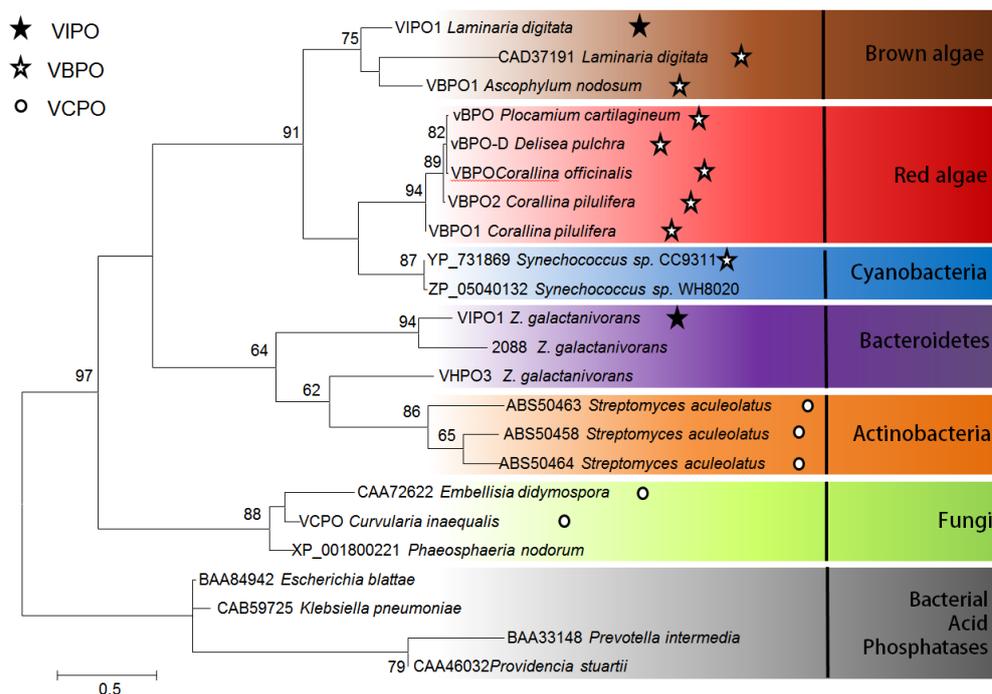


Figure III.46 - Alignement partiel de la séquence protéique de Zg-2088 avec des VHPO caractérisées biochimiquement. Les séquences de la VCPO de *C. inaequalis* (Ci-VCPO), les VBPO d'*A. nodosum* (An-VBPO1) et de *C. pilulifera* (Cp-VBPO1) et les VIPO de *L. digitata* (Ld-VIPO1) et *Z. galactanivorans* (Zg-VIPO1) et Zg-2088) sont alignées à l'aide du logiciel en ligne PROMALS3D (<http://prodata.swmed.edu/promals3d/promals3d.php>), fondé sur la structure de Ci-VCPO (code PDB: 1VNI). Les résidus caractéristiques de la signature des VHPO sont surlignés en gris foncé. Les hélices alphas décrites au niveau structural, sont surlignées en gris clair et celles prédites à l'aide du logiciel en ligne GOR (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl) sont représentées en lettres rouges. Les résidus de Zg-VIPO1 impliqués dans la boucle présente à l'entrée du site actif, sont annotés par un astérisque rouge.

Zg-2088	262	PNISHTKGHVMYFQQQISPGG HWMHIAAQI LEEQK-----VDGVKA	
Zg-VIPO1	264	PYVSVTRGHLMFATKKIT PGAHWMGI AKIAARKTN-----SDFAKI	
Ci-VCPO	295	NLI-----GTPPRFY NQIV RRIAV TYK -----KEED-----LANS-----EVNNADF	
Cp-VBPO1	336	-----ALY EAY L NA CL LILA -----NGV PF D-----PNL PFQ Q ED KL DN Q DV F VN FG S	
An-VBPO1	279	-----NIN TEAY R GAL L LLG -----LDAFN RAG V NG PF ID ID-----RQAG FVN FG I	
Ld-VIPO1	334	-----TV NTEAY RAAL L L LD PD Q GAD GRA IA S AP GL NG PY AD SS-----RQAG FVN Y GV	
Zg-2088	301	AETMS ML GVAL ADAF I SC WDQ K YKS -SL T PE-----	
Zg-VIPO1	303	LFAYT KAS VAM ADAF I SC WDE K YRS -N L IP ET -----	
Ci-VCPO	332	ARLF ALVDVACTDAG IF SW KEK W EF -E FW R ELS -----	
Cp-VBPO1	379	AH VL SLV TEV AT R AL K AVR Y Q K FN I HRR LR PE AT GGL IS VN K IA PI Q K-GES IF PE VD L A VE EL GD I LE KA	
An-VBPO1	321	SH Y FRL IGA AEL A QR SS WY Q KW Q VHR F AR PEAL GGL L LH L T IK GE -----LNAD FD L S L L EN AEL L K RV	
Ld-VIPO1	383	SH LM RL VG TAE LA Q KS A W Y Q K W N V H MF V PE AF GG S I H N V LL G K-----LDVE IA PS LL KN T D LL DR V	
Zg-2088	333	TY IN NY I-----DQD WE PI-----LQ T PA F PE HT SGH SVASS AAAT V L T G V F GD D	
Zg-VIPO1	335	- V IN Q H I -----D D SW K P V -----LQ T PP F PE YT SGH SVV S GAAS V V L TE V F G DN	
Ci-VCPO	364	-G V RDD GR PD H GD-----P F W L T L G A P A T N T N D I P F K P F P AY P SGH AT F GG AV F Q M V RR Y Y N GR	
Cp-VBPO1	448	E IS NR K Q NI AD GD P DP D P-----S F LL P MA F A-----E G SP F H PS Y G SGH AV V AG AC V T IL K A F FD S G	
An-VBPO1	384	AA IN AA Q N P N EV-----T Y LL P Q A I Q -----E G SP T H PS Y P SGH AT Q NG A F A T V L K AL I GL D	
Ld-VIPO1	446	AAR NG E IN GR PG V --LD-----R T Y LL S Q AL P -----E G SP T H PS Y P AGH AT Q NG A F A T V L K AL V GL E	
Zg-2088	377	Y A F VD-----A T E V F Y G-----L P PR S F Q S F	
Zg-VIPO1	379	F S F DD-----D T E V P Y G-----L P IR S F K S F	
Ci-VCPO	423	V GT W KD D EP D NI A ID M M I SE EL NG V NR D LR Q PY D PT A PI E D Q PG I VR-----T R I V R H F D SA	
Cp-VBPO1	506	I E I -----D Q V E VD K ED K L V K S S F K-----G T L T V A G E L	
An-VBPO1	437	R GGD-----C Y PD P V Y P D DD G L K L I D F R G -----S C L T F E G E I	
Ld-VIPO1	502	R GS V -----C F ND P V F P D DE G L T LL P Y T G-----D D GN N CL T F E G E I	
Zg-2088	398	W QA A E E AA I S R LY G GI H Y R PA I EL G V K Q G RA V GR L V L ER L R K EH-----	
Zg-VIPO1	400	K QA A E A AA I S R MY G GI H Y R AA I E V GV R Q G R D L G T F V V N K L H M L S D K K V-----A Q N-----	
Ci-VCPO	480	W EL M F E NA I S R I F L G V H W R F D AAA A R D I L I P T T K D V Y A V D N NG-----A T V F Q-----N	
Cp-VBPO1	537	N KL A D N I A I C R N MA G V H Y F S D Q F ES L L G E Q V A I G I L E Q S L T Y GEN F -----F F N L PK F D	
An-VBPO1	470	N KL A V N V A F C R Q M L GI H Y R Y D GI Q GL L GE T I T V R T L H Q E L M T F A E S -----T F E F R L F T	
Ld-VIPO1	539	N KL A V N V A L C R N M L GI H W R I D S E L G L L L G E T A A V R I L Q Q E A V A Y P E N A-----G Y E F R L M S	

Figure III.47 – Analyse phylogénétique des VHPO. Arbre de maximum de vraisemblance (PML) construit à partir d'un alignement multiple des 19 VHPO caractérisées sur le plan biochimique et 4 acides phosphatases bactériennes comme outgroup (131 positions utilisées pour l'analyse PML). La solidité de la topologie est testée par la méthode de bootstrap (500 répliquats).



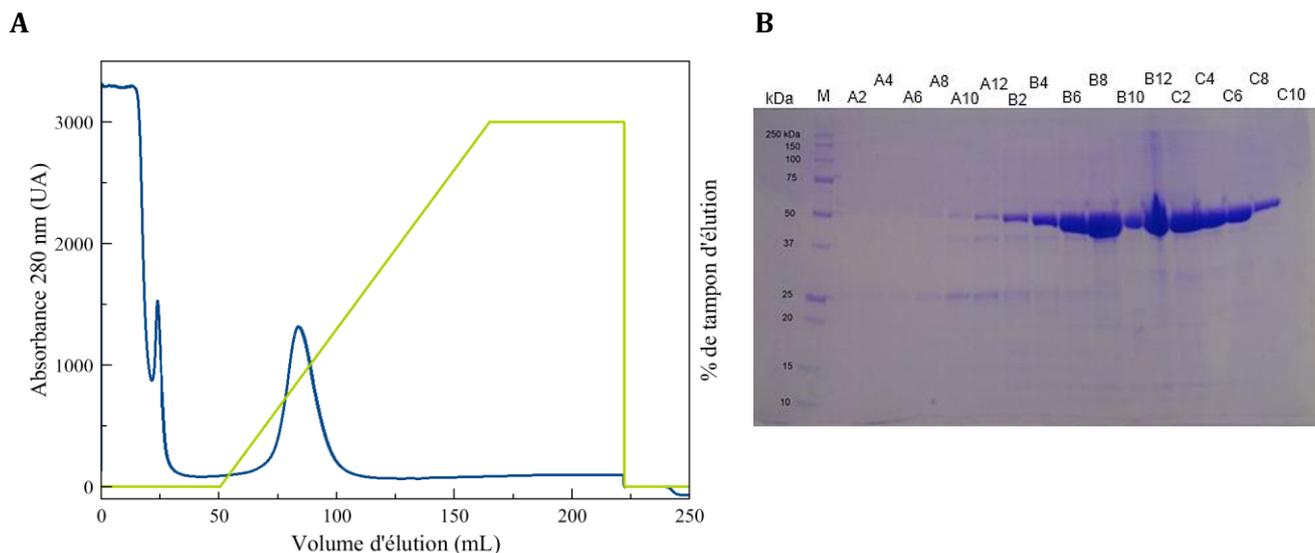
2.2 Production de la protéine recombinante purifiée Zg-2088

Le gène zg-2088 a été cloné durant l'une des phases du projet de clonage à moyen débit MARINE-EXPRESS [Groissillier *et al.*, 2010], dans un plasmide de surexpression pFO4 insérant une étiquette de six histidines en N-terminal. Les premiers tests de purification par chromatographie d'affinité ont été menés en utilisant le même protocole que celui utilisé pour Zg-VIPO1. Cependant, lors de la concentration de cette protéine, celle-ci précipite et empêche d'obtenir des concentrations supérieures à 1 mg/mL. Les fractions de protéine obtenues par chromatographie d'affinité ont donc été dialysées dans quatre tampons Tris HCl 50 mM pH7,5 en présence de 50, 100, 200 et 400 mM de NaCl puis concentrées. En présence de 200 mM NaCl, la protéine peut être concentrée à plus de 10 mg/mL (concentration minimale conseillée pour la cristallogénèse), c'est cette condition qui a été retenue pour la suite des manipulations.

La protéine a été purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (**Figure III.48-A**) et les fractions éluées ont été analysées sur un gel dénaturant (**Figure III.48-B**). Certaines fractions obtenues sont relativement pures, dès la fin de la première étape de purification. Une contamination par une protéine de 25 kDa est observée dans les premières fractions d'élution. Seules les fractions les plus pures (de B6 à C8, **Figure III.48-B**), situées à la fin du pic d'élution, sont

regroupées, concentrées, puis dialysées, afin d'éliminer l'imidazole. La quantité finale de la protéine Zg-2088 purifiée (22,4 mg pour 500 mL de culture bactérienne) est suffisante pour poursuivre des analyses biochimiques et structurales.

Figure III.48 - Purification de Zg-2088. (A) Profil d'élution de la protéine Zg-2088 sur colonne d'affinité au nickel. (B) SDS-PAGE des fractions correspondant au pic d'élution. L'absorbance à 280 nm de l'éluât est représentée en bleu. La concentration du tampon d'élution (TrisHCl 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, Imidazole 500 mM) est représentée en vert. Sur le gel, la ligne M: est celle du marqueur de poids moléculaire Precision Plus Protein standards (BioRad). Les lignes A2 à C10 correspondent aux fractions éluées autour du pic d'élution.

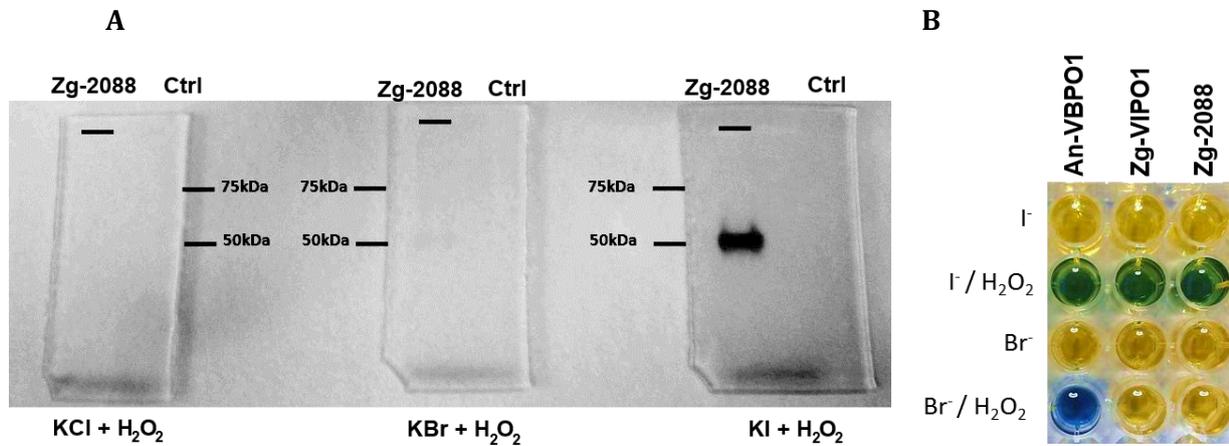


2.5 Caractérisation biochimique de Zg-2088

2.3.1 Caractérisation d'une seconde iodoperoxydase chez *Z. galactanivorans*

La spécificité de Zg-2088 a tout d'abord été testée à l'aide du test enzymatique basé sur l'*o*-dianisidine (**Figure III.49-A**) en gel natif. En parallèle un SDS-PAGE permet de contrôler la pureté de la protéine purifiée déposée dans le gel natif. Aucune bande colorée n'apparaît en présence de bromure ni de chlorure. Mais un précipité marron apparaît en présence de KI, correspondant à l'iodation de l'*o*-dianisidine. Un second test enzymatique fondé sur l'halogénéation du bleu de thymol a aussi été utilisé comme crible (**Figure III.49-B**) [Verhaeghe *et al.*, 2008a]. Zg-VIPO1, la VBPO d'*A. nodosum* (An-VBPO1) et Zg-2088 présentent une activité d'oxydation de l'iodure en présence de peroxyde d'hydrogène. A l'inverse aucune activité d'oxydation du bromure n'est observée pour les deux enzymes isolées de *Z. galactanivorans*. Ces résultats démontrent l'activité iodoperoxydase de l'enzyme Zg-2088, rebaptisée par la suite Zg-VIPO2.

Figure III.49 - Crible de la spécificité de Zg-2088 par test o-dianisidine en gel natif (A) et par test fondé sur le bleu de thymol (B). Gel de polyacrylamide non dénaturant chargé avec de l'eau ultra pure en contrôle négatif et chargé avec 10 µg d'enzyme purifiée Zg-2088. Les activités VCPO, VBPO et VIPO sont testées en présence respectivement de KCl, KBr et KI. Le test enzymatique fondé sur le bleu de thymol a été réalisé à température ambiante, dans un volume de 250 µL, composé de tampon phosphate pH 7,8 0,1M, bleu de thymol 100 µM, 2,5 µg d'enzyme purifiée, et soit du KI 1,5 mM et du peroxyde d'hydrogène 0,42 µM soit du KBr 10 mM et du H₂O₂ 0,1 mM. Les contrôles positifs utilisés sont la bromoperoxydase purifiée d'*A. nodosum* (An-VBPO1) et l'iodoperoxydase de *Z. galactanivorans* (Zg-VIPO1). De plus, les tests sont menés en présence ou non de peroxyde d'hydrogène.



2.3.2 Détermination des paramètres cinétiques de Zg-VIPO1 et Zg-VIPO2

Les tests enzymatiques fondés sur le bleu de thymol permettent d'obtenir des paramètres cinétiques et de comparer Zg-VIPO1 et Zg-VIPO2 (Zg-2088). Cette seconde iodoperoxydase présente la même affinité (K_m) pour l'iodure que Zg-VIPO1 et sa constante catalytique (k_{cat}) est aussi très semblable (**Table III.10**).

Si l'affinité pour l'iodure est similaire, les activités de Zg-VIPO1 et Zg-VIPO2 restent cependant beaucoup plus faibles par rapport à la constante mesurée pour l'isoforme 1 de la bromoperoxydase d'*A. nodosum* ($K_m^{I^-} = 0,18 \text{ mM}$; $k_{cat} = 75 \text{ s}^{-1}$; $k_{cat}/K_m = 416,6 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$) [Verhaeghe et al., 2008a].

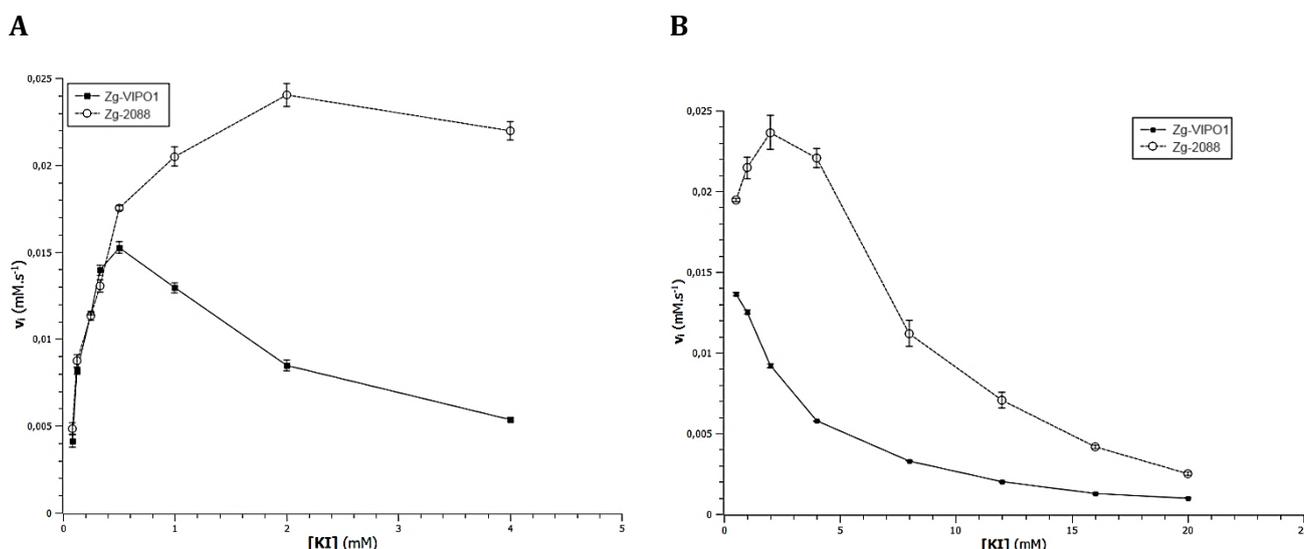
Dans la littérature, il a été décrit un effet inhibiteur des substrats sur l'activité des haloperoxydases. Des tests ont été donc entrepris à différentes concentrations allant de 0,05 mM à 20 mM d'iodure. Un effet inhibiteur de l'iodure est observé pour Zg-VIPO1 à 0,5 mM d'iodure tandis que cet effet n'est observable pour Zg-VIPO2 qu'à plus de 2 mM (**Figure III.50**). Ces tests devront être complétés avec de nouveaux essais afin de déterminer la constante d'inhibition de l'iodure ($K_i^{I^-}$) et le type d'inhibition. Cependant au niveau physiologique, des concentrations supérieures à 0,5 mM en iodures sont rares dans la mer (la concentration moyenne en surface est de 0,5 µM), sauf dans le cas de certaines algues comme *L. digitata*, qui concentrent de manière très

importante l'iode. Donc, malgré un effet inhibiteur à fortes concentrations d'iodeure, ces enzymes ne sont pas inhibées dans les conditions physiologiques, c'est-à-dire dans un environnement de type eau de mer.

Table III.10 - Paramètres cinétiques de Zg-VIPO1 et Zg-VIPO2.

Enzyme	K_M		k_{cat}		k_{cat}/K_M
	mM	+/-	s ⁻¹	+/-	
Zg-VIPO1	0,22	0,01	1,98	2,14	9,00
Zg-VIPO2	0,22	0,02	2,04	4,02	9,27

Figure III.50 - Effet inhibiteur de l'iodeure sur l'activité des enzymes Zg-VIPO1 et Zg-VIPO2. Les vitesses initiales obtenues par le test enzymatique fondé sur le bleu de thymol à des concentrations comprises entre 0,05 mM et 4 mM (A) et entre 0,5 mM et 20 mM (B) de KI. Les réactions sont faites dans 250 µL d'un tampon composé de phosphate 0,1 M pH 7,8, bleu de thymol 100 µM, 2,5 µg d'enzyme purifiée et peroxyde d'hydrogène 0,42 µM.



L'enzyme Zg-VIPO2 est donc une iodoperoxydase, qui présente des constantes catalytiques similaires avec Zg-VIPO1. Cependant elle présente une plus forte résistance face aux fortes concentrations d'iodes. La troisième VHPO annotée dans le génome de *Z. galactanivorans* pourrait présenter une spécificité différente pour l'halogénure. Elle reste à caractérisée dans cette flavobactérie marine par la même approche que celle employée pour Zg-VIPO1 et Zg-VIPO2.

3 Conclusions et perspectives

L'objet de ce chapitre était l'étude et la caractérisation biochimique de deux protéines, Zg-4305 et Zg-2208, de *Z. galactanivorans*, présentant des homologies de séquences avec des gènes impliqués dans le métabolisme de l'iode.

La première protéine, Zg-4305, appartient à un groupe de protéines de fonction inconnue, très proches de la famille des iodotyrosines déiodinases (IYD) caractérisées chez les mammifères. L'analyse phylogénétique a mis en évidence que la protéine Zg-4305 appartient à une nouvelle famille de protéines bactériennes, partageant un ancêtre commun proche avec les iodotyrosine déiodinases animales. La recherche de protéines homologues dans la banque de données de séquences protéiques du NCBI montre que celles-ci sont présentes chez des bactéries appartenant aux classes des Flavobacteriia, Sphingobacteriia et Cytophagia qui ont majoritairement été isolées dans un environnement aquatique.

L'analyse *in silico* de la séquence primaire de cette protéine a montré une forte conservation des résidus caractérisés chez les IYD de mammifères comme ceux liants le cofacteur FMN et l'un des substrats, la 3-iodo-L-tyrosine. Deux substitutions sont cependant observées dans l'une des régions se liant avec la FMN. L'une de ces substitutions induit le remplacement d'une thréonine présente chez les IYD de mammifères en une histidine chez Zg-4305. Cependant l'analyse de la structure connue de l'IYD de souris montre que ce résidu ne forme pas de contact polaire avec le FMN, mais avec un feuillet β [Thomas *et al.*, 2009]. La présence d'une histidine à cette position dans la protéine de *Z. galactanivorans* reste donc compatible avec une liaison à la FMN.

La purification de la protéine recombinante Zg-4305 a révélé la présence d'un composé coloré co-purifié. L'analyse par spectrométrie de masse a montré que ce composé était du FMN. Ce composé est un cofacteur naturel des iodotyrosine-déiodinases et plus globalement des nitro-FMN-réductases. De plus, l'analyse par gel filtration de Zg-4305 a mis en évidence que la protéine forme un homodimère comme les autres enzymes de cette superfamille caractérisées au niveau structural.

Les premières expériences *in vitro* n'ont pas permis de caractériser une activité de déhalogénéation pour Zg-4305 sur les substrats commerciaux tels que la 3-iodo-L-tyrosine ou la 3,5-diiodo-L-tyrosine, en présence de différents agents réducteurs (NADH, NADPH et dithionite). Il

sera nécessaire, dans le futur, de tester d'autres substrats potentiels, comme ceux présentant un cycle phénolique ou benzénique iodé.

Ce travail de thèse a aussi permis de caractériser sur le plan biochimique, une nouvelle iodoperoxydase à vanadium chez *Z. galactanivorans*. L'analyse des séquences primaires montre que Zg-VIPO2 possède sans doute aussi une boucle obstruant l'entrée du site actif comme Zg-VIPO1, ainsi que la même composition en acides aminés dans le site actif. Cette enzyme ne possède pas de peptide signal d'adressage au périplasma tout comme Zg-VIPO1. La troisième haloperoxydase putative, codée par le gène *zg-2250*, suggère une localisation intracellulaire ou cytoplasmique de Zg-VIPO2.

Les caractérisations enzymatiques de Zg-VIPO2 montrent que les paramètres catalytiques sont équivalents à ceux de Zg-VIPO1. Cependant cette seconde iodoperoxydase est moins sensible à l'effet d'inhibition par l'iode.

En perspective, il sera également intéressant de caractériser biochimiquement, la troisième protéine codée par le gène *zg-2250*. En effet cette protéine ne possède que 20 % d'identité avec Zg-VIPO1 et il est donc très difficile de déterminer sa spécificité de cette enzyme par la simple analyse de sa séquence. D'autre part, bien que les enzymes Zg-VIPO1 et Zg-VIPO2 soient très proches tant au niveau de leurs séquences primaires qu'au niveau de leurs paramètres catalytiques, leurs localisations cellulaires différentes suggèrent des rôles biologiques bien distinctes dans la physiologie bactérienne. Il serait ainsi intéressant d'étudier l'expression de ces deux gènes ainsi que celle de *zg-2250* et *zg-4305*, par PCR quantitative dans différentes conditions de croissance et de stress (par exemple en présence de fortes concentrations d'iode, d'ERO, ou d'extraits de paroi d'algue), et/ou de localiser par immunomarquage, la localisation précise des protéines exprimées *in vivo*. Les résultats permettront tout d'abord, de savoir si ces quatre gènes sont co-exprimés de manière ubiquitaire ou s'ils sont exprimés dans différentes conditions de croissance et de stress. Enfin, on pourra développer à terme, des approches fonctionnelles en produisant des mutants de un ou plusieurs gènes chez *Z. galactanivorans* qui est un outil développé dans l'unité. Ces études permettront, par la suite, de mieux comprendre la fonction biologique de ces gènes et le rôle de ce potentiel métabolique de l'iode de *Z. galactanivorans*.

1 Evolution des haloperoxydases à vanadium

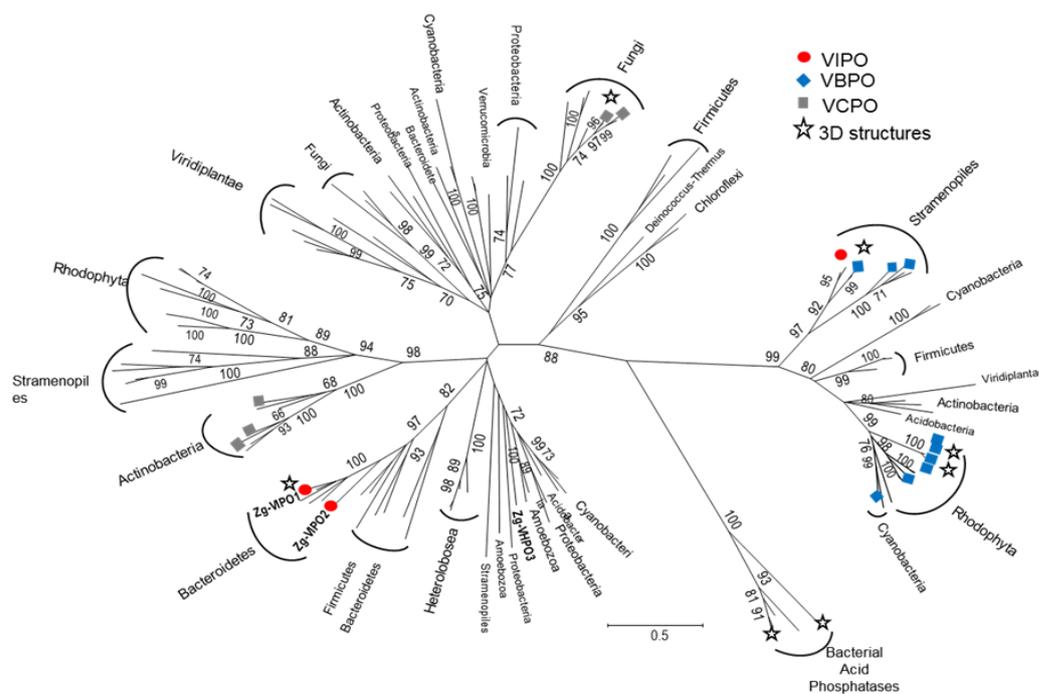
Zg-VIPO1 est la première iodoperoxydase à vanadium à être caractérisée au niveau biochimique et structural. Les données obtenues avec Zg-VIPO1 permettent d'étudier les mécanismes moléculaires contrôlant la spécificité pour les halogénures chez les VHPO d'un nouveau point de vue. En effet, jusqu'à présent, les études sur ces mécanismes ont toujours été menées dans le but d'obtenir des mutants de VBPO ou VCPO, ayant une plus grande de spécificité.

L'enzyme Zg-VIPO1 présente une similarité relativement faible (<20% d'identité) avec les autres VHPO caractérisées au niveau structural. Cependant, l'analyse phylogénétique des VHPO fondée sur un arbre de maximum de vraisemblance, analysant les régions C-terminal (régions portant le site actif, les plus conservées chez les VHPO), montre la présence de deux groupes de protéines séparés et hétérogènes (**Figure IV.51**). Dans chaque groupe des protéines bactériennes et eucaryotiques sont retrouvées. Le premier cluster est fortement soutenu par une valeur de bootstrap de 99%, et rassemble les protéines caractérisées chez les algues brunes (Stramenopiles) et rouges (Rhodophyta), ainsi que des protéines homologues identifiées sur certains génomes bactériens, comme ceux de cyanobactéries. Le second groupe réunit de nombreuses séquences bactériennes provenant de *phyla* différents (Firmicutes, Cyanobactérie, Proteobacteria, Bacteroidetes et Actinobacteria), ainsi que des VCPO caractérisées chez des champignons ou des Actinobactéries, ou encore des séquences homologues identifiées sur les génomes de *Chondrus crispus* [Collén *et al.*, 2013] et *Ectocarpus siliculosus* [Cock *et al.*, 2010].

Les deux iodoperoxydases caractérisées chez *Z. galactanivorans* sont associées avec des séquences identifiées sur les génomes de Bacteroidetes marines. La troisième VHPO3 (Zg-2250) se regroupe avec d'autres séquences issues de génomes de bactéries variées, dans un groupe mal défini. Cette analyse est en accord avec l'étude du contexte génétique de ces gènes qui montre que Zg-VIPO1 et Zg-VIPO2 seraient les plus proches (cf. **partie III.2.1**). Il est donc possible que Zg-VIPO1 et 2 d'un côté et Zg-VHPO3 de l'autre soient issues de deux histoires évolutives divergentes. Il est intéressant de noter que les haloperoxydases s'associent en fonction des organismes dans lesquels elles ont été isolées et non en fonction de leurs spécificités pour un halogénure. Cette analyse montre donc que la spécificité pour l'iodure chez les haloperoxydases à vanadium est apparue au minimum deux fois au cours de l'histoire évolutive, chez les algues brunes et chez certaines Bacteroidetes marines, et provient sans doute d'une convergence évolutive.

Par conséquent la simple comparaison de la composition en acides aminés entre les différentes VHPO ne suffit pas pour décrypter les mécanismes moléculaires à l'origine de la spécificité pour des halogénures. En effet, Zg-VIPO1 et Ld-VIPO1 présentent toutes les deux une spécificité pour l'iodure, cependant la composition de leur site actif est très différente [Colin *et al.*, 2005]. De plus, Zg-VIPO1 présente un site actif identique à celui de Ci-VCPO, et semble phylogénétiquement plus proche des VCPO de champignons, que des VHPO d'algues. Par conséquent, durant ce travail de thèse j'ai décidé de me concentrer sur la comparaison entre Ci-VCPO et Zg-VIPO1, afin de rechercher les mécanismes à l'origine du passage d'une VCPO à une VIPO.

Figure IV.51 - Arbre de maximum de vraisemblance (PML) construit à partir d'un alignement multiple de 122 VHPO et 5 phosphatases acides non spécifiques. Ces dernières sont utilisées comme groupe d'enracinement.



2 Différences structurales du tunnel d'accès au site actif entre Zg-VIPO1 et Ci-VCPO

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux différences du tunnel d'accès au site actif. L'analyse du tunnel de Zg-VIPO1 montre un rayon de 1,2 Å à 2,6 Å (**Figure IV.52-A et B**). Cependant le rayon moyen du tunnel de Zg-VIPO1 est inférieur au rayon ionique de Pauling de l'iodure (2,16 Å), tandis que chez Ci-VCPO, le rayon moyen est supérieur au rayon ionique de Pauling de l'iodure et du chlorure (**Figure IV.52-C et D**). Bien que Zg-VIPO1 réagisse avec des

iodures, l'analyse de la structure montre que le rayon est bien inférieur au rayon ionique de l'iodure et pourrait donc gêner l'entrée de cet halogénure dans le tunnel.

L'analyse de la composition du tunnel du site actif de Zg-VIPO1 montre qu'un côté est composé majoritairement de résidus non polaires et que sur l'autre face des résidus polaires puis basiques sont présents (**Figure 53-A et B**). Chez Ci-VCPO, une face est composée de résidus polaires à l'entrée puis apolaires. Sur la seconde face du tunnel, des résidus acides sont présents vers l'entrée du tunnel, puis des résidus basiques sont présents à proximité du site actif. (**Figure 53-C et D**). Chez la chloroperoxydase de *C. inaequalis* un patch de résidus à l'entrée du site actif n'est pas présent chez Zg-VIPO1.

Figure IV.52 - Taille du tunnel d'accès au site actif de Zg-VIPO1 (A et B) et Ci-VCPO (C et D). Les protéines sont représentées en ruban et l'histidine liant le vanadate ainsi que ce dernier sont représentés en bâtonnet. Les cavités des tunnels d'accès aux sites actifs sont représentées en surface. (B et D) Le rayon du tunnel est donné en fonction de distance par rapport au fond du tunnel. Les rayons ioniques de Pauling de l'iodure (2,16 Å) et du chlorure (1,81 Å) sont indiqués par des tirets rouges.

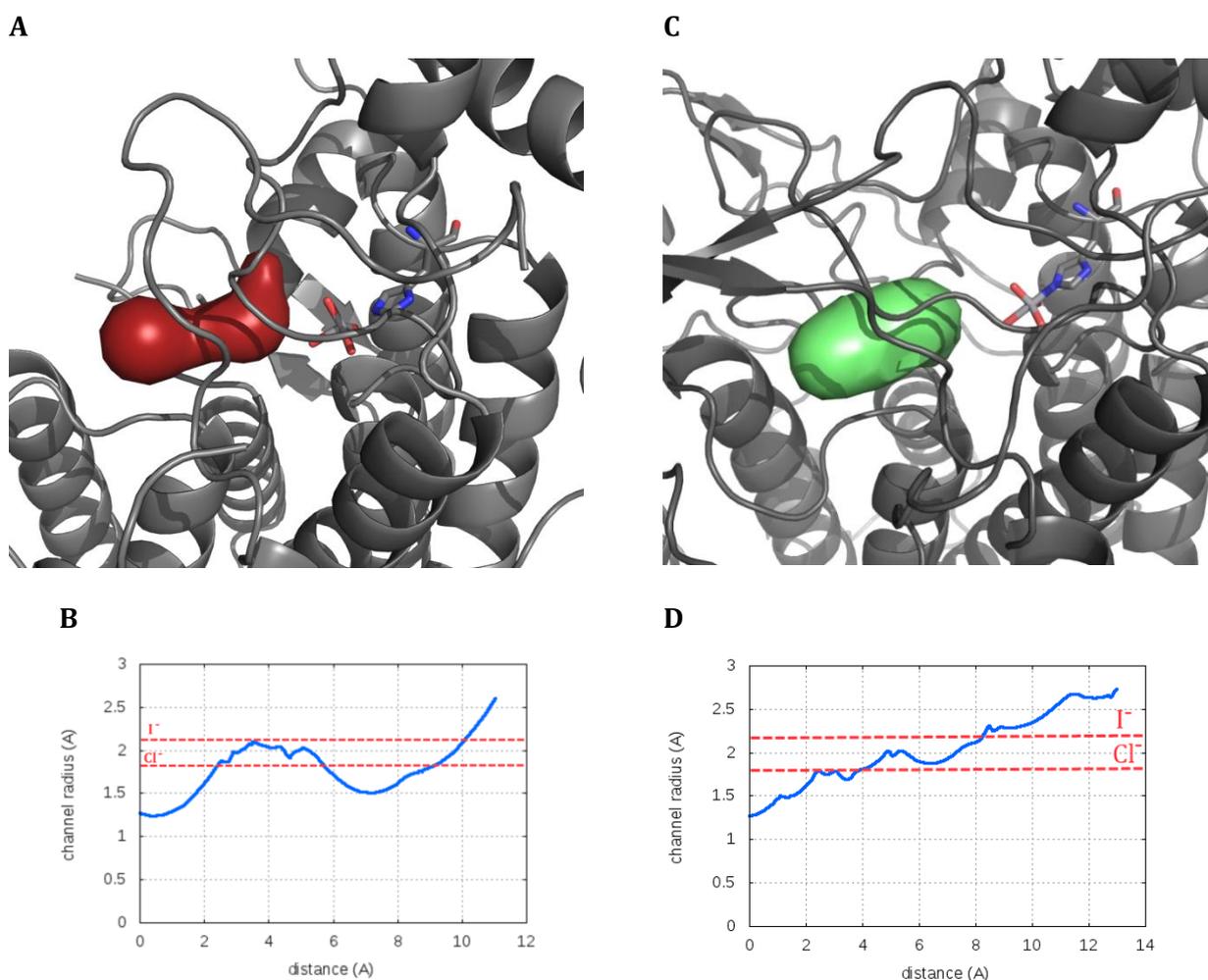
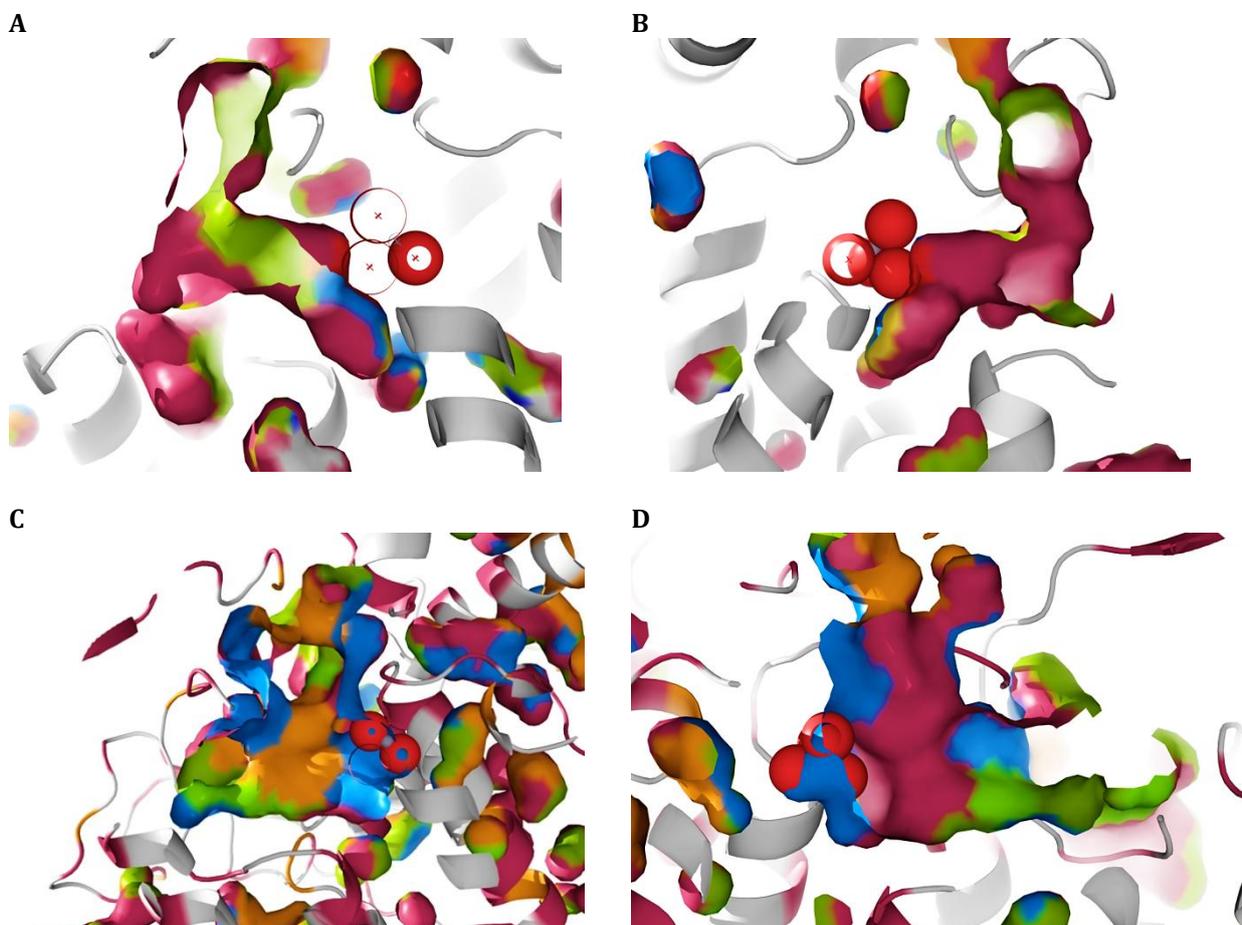


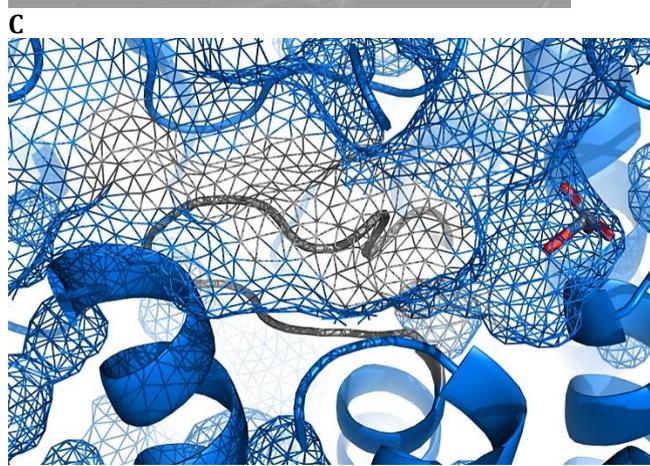
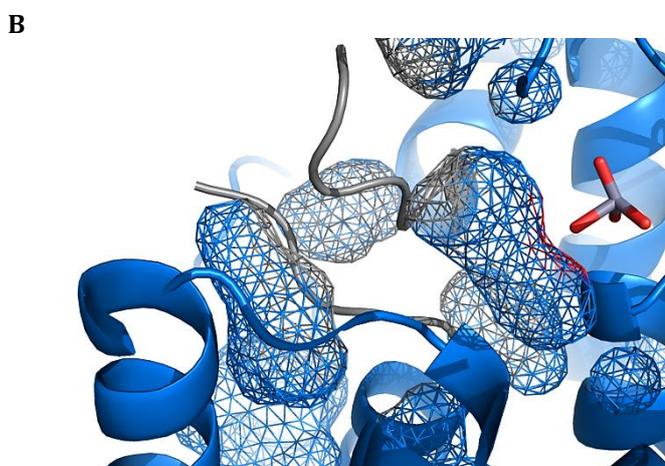
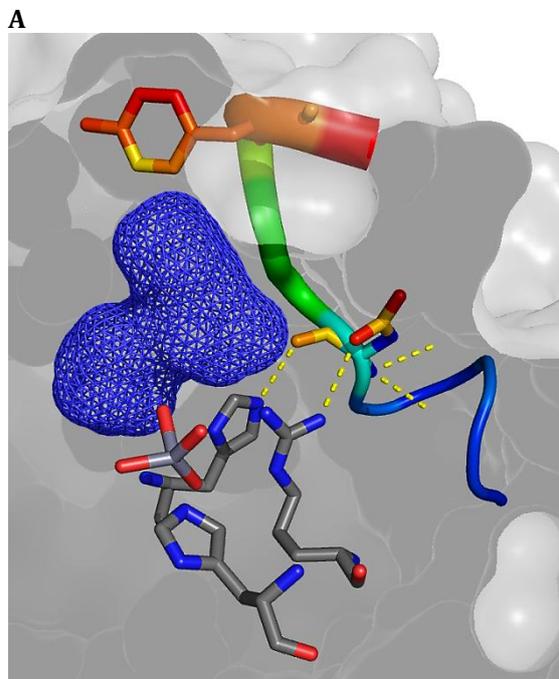
Figure 53 – Composition du tunnel d'accès au site actif de Zg-VIP01 (A et B) et Ci-VCPO (C et D). Les surfaces des résidus polaires, non polaires, acides et basiques sont respectivement colorées en vert, rouge, jaune et bleu. La protéine et les atomes du vanadate sont représentés respectivement en ruban et en sphère.



L'analyse de la structure de Zg-VIPO1 révèle également la présence d'une boucle à l'entrée du site actif. Celle-ci est partiellement visible au niveau structural à cause d'une agitation trop importante dans le cristal (**Figure IV.54-A**). Une même boucle est présente chez Ci-VCPO, mais celle-ci est beaucoup plus courte et n'obstrue pas l'entrée de la cavité du site actif (**Figure IV.54-B et C**). L'analyse de la séquence de Zg-VIPO2 (Zg-2088) semble indiquer que cette protéine possède aussi une longue boucle (

Figure 22). Cependant la tyrosine présente chez Zg-VIPO1 et obstruant le tunnel est substituée par une asparagine chez Zg-VIPO2. Enfin, la boucle possède un acide aspartique qui forme un pont salin avec l'Arg410 et une liaison hydrogène avec l'His360 (**Figure IV.54-A**), ces deux résidus ont été décrits chez Ci-VCPO comme des résidus nécessaires à l'activité haloperoxydase.

Figure IV.54 - Zg-VIPO1 possède une boucle obstruant l'accès du site actif. (A) La boucle obstruant la cavité du site actif est représentée en ruban et est colorée en fonction de l'agitation (B-factor) allant du bleu au rouge. La tyrosine qui bouche l'entrée et un acide aspartique formant des liaisons hydrogène avec deux résidus du site actif sont représentés en bâtonnet et colorés en fonction de leurs agitations. La surface de la protéine est représentée en gris clair et celle de la cavité du site actif en bleu. Les liaisons hydrogènes ou ponts salins sont représentés en tirets jaunes. Les surfaces des cavités internes de Zg-VIPO1 (B) et Ci-VCPO (code PDB : 1VNI) (C) sont représentées en maille bleue. Les boucles obstruant l'entrée du site actif chez Zg-VIPO1 et chez CI-VCPO sont colorées en gris. Le vanadate est représenté en bâtonnet.



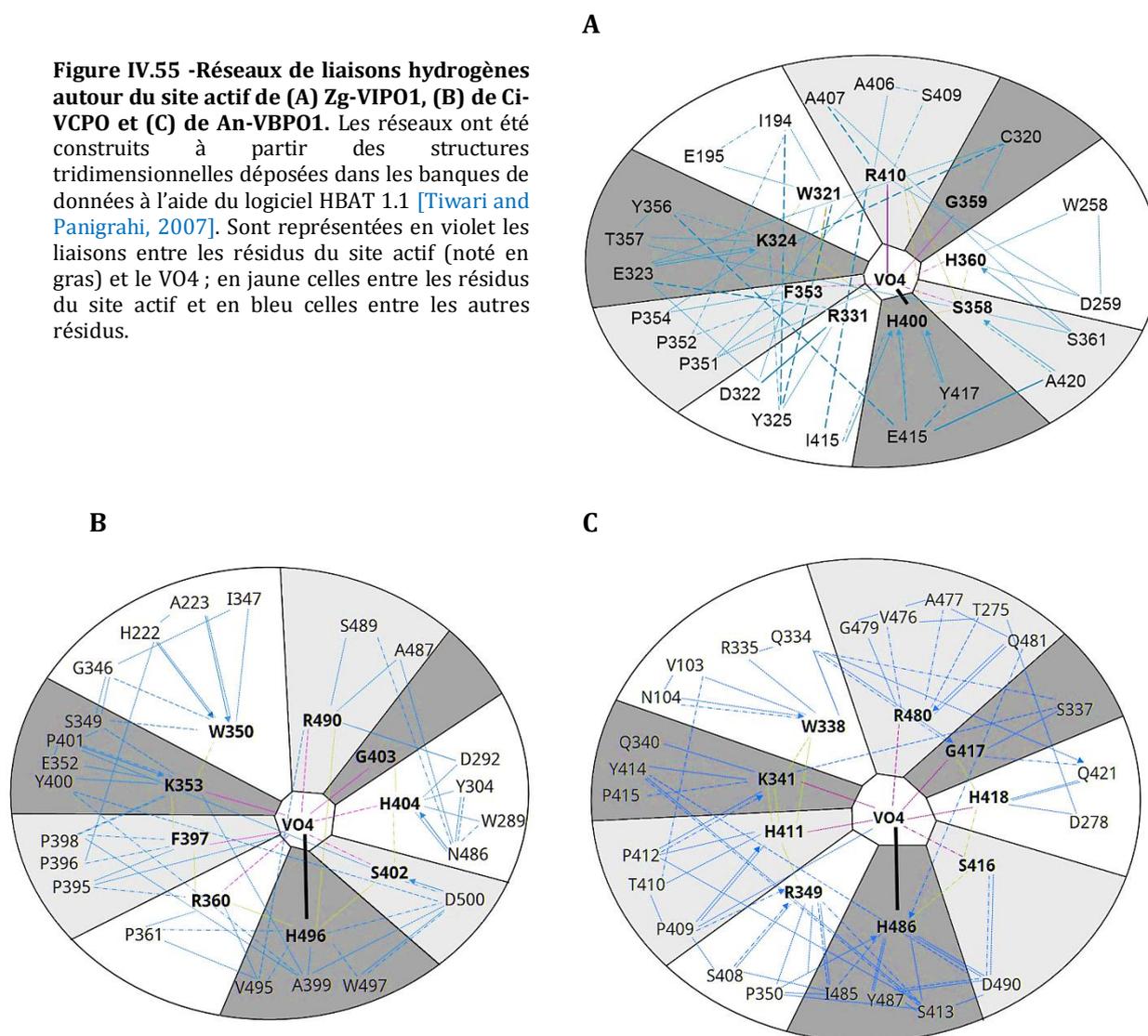
3 Comparaison des réseaux de liaisons hydrogène entourant le vanadate

Zg-VIPO1 présente un faible taux de similarité de séquence avec les autres VHPO. Il est donc compliqué d'observer les différences entre Zg-VIPO1 et d'autres VHPO. Afin de localiser les résidus importants structurellement et d'étudier les différences de composition en acides aminés entre ces différentes enzymes, j'ai décidé d'analyser les réseaux de liaisons hydrogènes entre les résidus du site actif et les résidus présents dans la seconde sphère. Ce réseau de liaisons hydrogènes a été

déterminé à partir des structures publiées de Ci-VCPO et An-VBPO1, ainsi que celle de Zg-VIPO1 (**Figure IV.55**). Cette analyse met en avant la présence d'un patch de trois prolines conservées chez les trois VHPO analysées (Pro351, Pro352 et Pro354 chez Zg-VIPO1) à l'arrière de l'une des arginines (Arg331^{Zg-VIPO1}) et l'histidine ou phénylalanine (Phe353^{Zg-VIPO1}). Un résidu d'acide glutamique (Glu323^{Zg-VIPO1}), formant des liaisons hydrogènes avec la Lys324^{Zg-VIPO1} et l'Arg331^{Zg-VIPO1}, est aussi présent chez Ci-VCPO mais celui-ci est remplacé chez An-VBPO1 par un autre résidu polaire, une glutamine. Enfin, une tyrosine forme des liaisons hydrogènes avec la lysine (Lys324^{Zg-VIPO1}) et est présente chez les trois VHPO analysées.

Cette analyse a aussi permis d'identifier trois résidus qui diffèrent entre Ci-VCPO et Zg-VIPO1 à une plus grande distance du vanadate. En effet, les substitutions d'acides aminés dans la seconde sphère pourraient être à l'origine de modifications fines de l'orientation des résidus du site actif, qui agiraient sur la coordination du vanadate, et seraient à l'origine des mécanismes moléculaires de spécificité.

Figure IV.55 -Réseaux de liaisons hydrogènes autour du site actif de (A) Zg-VIP01, (B) de Ci-VCPO et (C) de An-VBP01. Les réseaux ont été construits à partir des structures tridimensionnelles déposées dans les banques de données à l'aide du logiciel HBAT 1.1 [Tiwari and Panigrahi, 2007]. Sont représentées en violet les liaisons entre les résidus du site actif (noté en gras) et le VO4 ; en jaune celles entre les résidus du site actif et en bleu celles entre les autres résidus.



L'étude du réseau de liaisons hydrogènes aura aussi permis de compléter la signature protéique communes aux VHPO. En effet, les trois courtes séquences ci-dessous, comprenant les douze résidus du site actif, ont souvent été utilisées pour regrouper les haloperoxydases à vanadium et les acides phosphatases [Stukey and Carman, 1997; Hemrika *et al.*, 1997; Neuwald, 1997]:

KxxxxxxRP
PSGH
SRxxxxxHxxxD

L'alignement de séquences de VHPO à l'aide du logiciel en ligne Promals3D a permis de confirmer cette analyse et d'ajouter de nouveaux résidus conservés à ceux déjà localisés précédemment. La signature des haloperoxydases à vanadium comprend donc trois domaines :

[C,S,V,A]-W-x-[E,Q]-W-x-K-[Y,W,F]-xxxxxx-RP
s-W-x-p-W-x-K-@-xxxxxx-RP

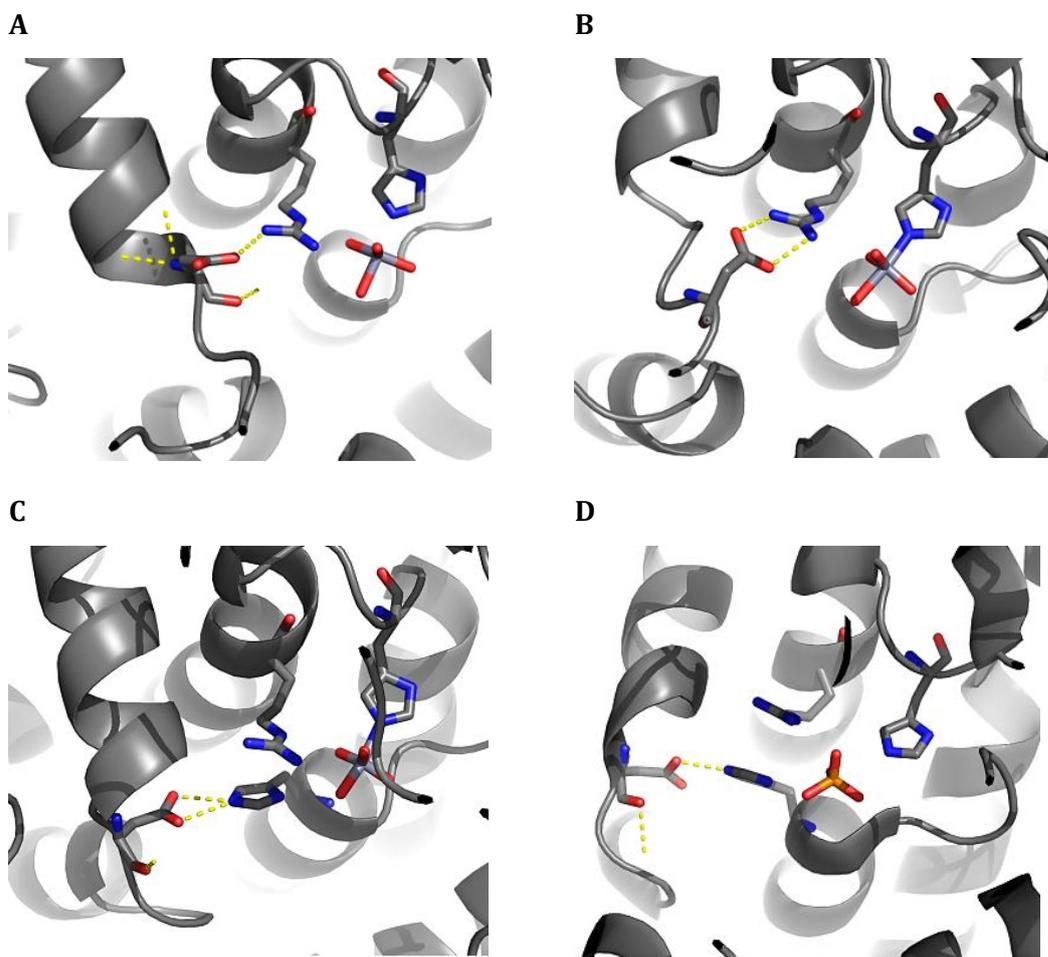
P-x-[H,F]-P-x-Y-[T,G,P]-SGH-[A,S]-xxx-[G,S]-A
P-x-@-P-x-Y-s-SGH-s-xxx-G-A

A-[I,L,F]-[G,S]-R-xxx-G-[I,V]-H-[Y,W]-[W,F]-x-D
A-h-t-Rxxx-G-l-H-@-p-x-D

Dans ces trois domaines consensus, les résidus annotés par un *t* sont très petits (A, G, S, C), par un *p* sont polaires (D, E, H, K, N, Q, R, S, T), par un *s* sont petits (A, G, C, S, V, N, D, T, P), par un *h* sont hydrophobes (W, F, Y, M, L, I, V, A, C, T, H) et *l* sont aliphatiques (I, V, L). Un acide aspartique est aussi conservé en amont de ces trois domaines à une distance comprise entre 56 et 69 résidus selon la protéine. La séquence primaire autour de cet acide aminé n'est pas conservée cependant il est présent chez toutes les VHPO caractérisées au niveau structural et porté sur la boucle présente à l'entrée du site actif chez Zg-VIPO1 (entre l'hélice 9 et 10). Cet acide aspartique forme un pont salin avec une des arginines du site actif chez Zg-VIPO1 (Arg410^{Zg-VIPO1}) et Ci-VCPO (**Figure IV.56-A et -B**), soit avec l'histidine catalytique chez An-VBPO1 (His411^{An-VBPO1}) et Cp-VBPO (**Figure IV.56-C et -D**).

La comparaison des structures, des séquences primaires et la comparaison des réseaux de liaisons hydrogènes montrent la conservation de plus de résidus, que ceux présents dans le site actif. Cette étude apporte ainsi de nombreuses pistes à explorer pour identifier les résidus à l'origine des mécanismes moléculaires de la spécificité pour un halogénure chez Zg-VIPO1.

Figure IV.56 - Conservation de l'acide aspartique chez les VHPO. Chez Zg-VIPO1 (A) et Ci-VCPO (code PDB : 1VNI) (B) ce résidu forme un pont salin avec une arginine du site actif. Chez An-VBPO1 (code PDB : 1QI9) (C) et Cp-VBPO (code PDB : 1UP8) (D), l'acide aspartique forme un pont salin avec l'histidine catalytique. Les histidines catalytiques et liant le vanadate, l'arginine présent dans le site actif et l'acide aspartique sont représentés en bâtonnet. Les ponts salins et liaisons hydrogènes sont représentés en tiret jaune.



4 Mutagenèse dirigée et production de mutants de Zg-VIPO1

Afin d'étudier ces mécanismes, nous avons décidé d'utiliser une approche par mutagenèse dirigée. Cette méthode permet de substituer de manière spécifique un résidu par un autre et de caractériser le rôle des différents résidus potentiellement impliqués dans le cycle catalytique.

Les premières cibles visées dans cette étude ont été tout d'abord la boucle présente à l'entrée du site actif, ainsi que la tyrosine (Tyr263) obstruant l'entrée. La Tyr263 a été substituée par des résidus plus ou moins hydrophobes ou présentant des propriétés chimiques proches (**Table IV.11**). En parallèle nous avons aussi tenté de supprimer la boucle par PCR (protocole présenté dans la **Figure IV.57**), cependant cette approche n'a pas été couronnée de succès. Nous nous

sommes donc concentrés sur les trois mutations ponctuelles de la Tyr263, pour étudier le rôle de la boucle (**Table IV.11**).

Dans le site actif de Zg-VIPO1, 7 résidus sur les 9 présents ont été modifiés par mutagenèse dirigée (**Table IV.11**). Les deux histidines ont été mutées en alanine afin d'éteindre la fonction de ces résidus. L'histidine catalytique (His360) a aussi été mutée en sérine. En effet, un groupe formé de VHPO d'origines diverses (algues et Actinobactéries) présente dans leurs séquences une substitution de l'histidine catalytique par une sérine. Cette mutation permet donc d'explorer l'activité des enzymes de ce groupe.

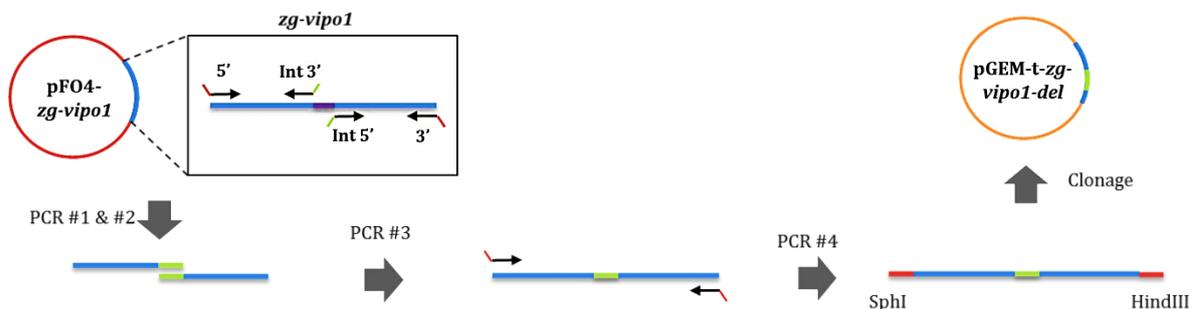
Les mutants Ser358Ala et Trp321Arg visent à mimer partiellement les sites actifs respectifs de Ld-VIPO1 et Cp-VBPO ou Co-VBPO. Le mutant Phe353His mime totalement le site actif d'An-VBPO1. Enfin, les deux arginines présentes dans le site actif sont mutées en alanine afin d'étudier leurs rôles dans le cycle catalytique.

Finalement, l'analyse des réseaux de liaisons d'hydrogènes a permis d'identifier des résidus en contact avec ceux présents dans le site actif, pouvant modifier soit leurs orientations, soit la force des liaisons hydrogènes qu'ils forment avec le vanadate. De plus, les résidus présents chez Zg-VIPO1 sont différents de ceux observés chez Ci-VCPO et An-VBPO1. Dans la seconde sphère de coordination du vanadate, trois acides aminés ciblés sont soit mutés en alanine, soit substitués par le résidu présent chez Ci-VCPO ou An-VBPO1 (**Table IV.11**).

Table IV.11 - Production et analyses des mutants de Zg-VIPO1, obtenus par mutagenèse dirigée. Certains mutants de Zg-VIPO1 ont pu être étudiés au niveau structural par des approches d'absorption de rayon X (XAS) et de diffraction des rayons X (DRX)

Nom	Mutagenèse	Clonage	Purification	Activité enzymatique	XAS	Cristallogénèse	DRX
Boucle	Tyr263Ala	✓	✓	✓	✓		
	Tyr263Phe	✓	✓	✓	✓		
	Tyr263Ser	✓	✓	✓	✓		
	Délétion-boucle	×					
	Trp321Arg	✓	✓	✓	✓		
	Arg326Ala	✓	✓	×			
Site actif	Phe353His	✓	✓	✓	✓	✓	
	Ser358Ala	✓	✓	✓	✓		
	His360Ala	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	His360Ser	✓	✓	✓	✓		
	His416Ala	×					
	Arg410Ala	✓	✓	✓	✓		
2 nd sphère	Cis320Ala	✓	✓	×			
	Cis320Ser	✓	✓	✓	✓		
	Asp322Ala	✓	✓	×			
	Asp322Lys	✓	✓	✓	✓		
	Asp322Tyr	✓	✓	✓	✓		
	Glu415Ala	✓	✓	×			
WT		✓	✓	✓	✓	✓	✓

Figure IV.57 - Protocole pour supprimer par PCR la boucle obstruant le site actif chez Zg-VIPO1. Les régions en amont et en aval de la séquence codant pour la boucle du gène *zg-vipo1* sont amplifiées par PCR (PCR #1 et #2). Les amorces internes (Int 3' et Int 5') permettent d'insérer une nouvelle séquence plus courte. Les produits des deux premières PCR sont ensuite fusionnés par PCR (PCR #3). Deux sites de clivages nécessaires au clonage sont ajoutés au dernier produit de PCR (PCR #4) pour le clonage dans un plasmide pGEM-t.

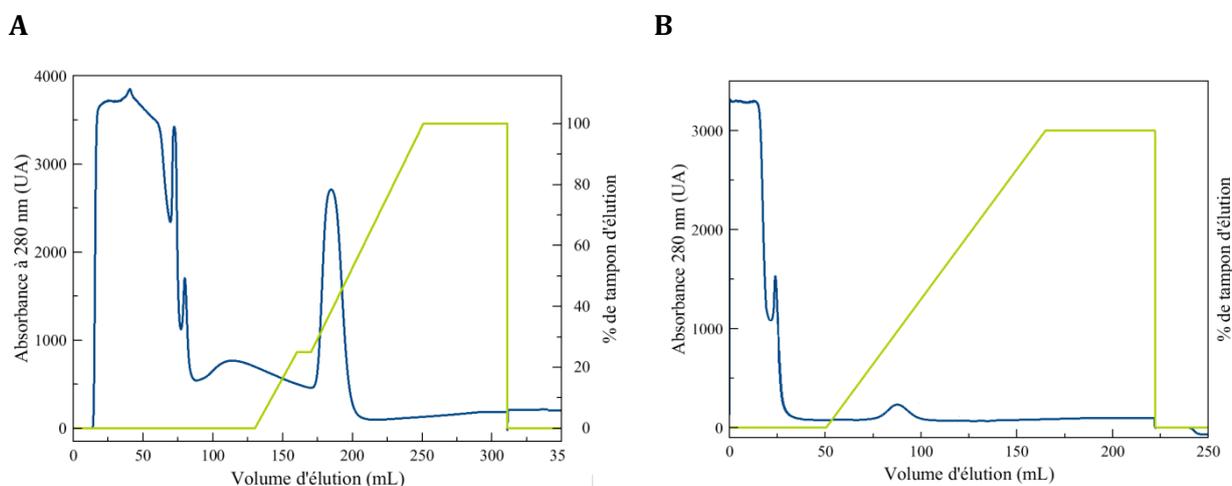


Sur les 18 mutants envisagés, 16 mutagenèses ciblées ont abouti après deux séries d'expériences successives. Seuls les mutants visant à supprimer la boucle et à substituer l'His416 par une alanine n'ont pas été obtenus après le second essai. La présence de la mutation et l'intégrité de la séquence codante ont été vérifiées par séquençage, puis la souche d'expression BL21(DE3) a été transformée avec les plasmides pFO4-*zg-vipo1XnnnX* dans le but de produire les protéines mutées de Zg-VIPO1.

Des tests de surexpression ont été menés dans des cultures de 15 mL de milieu de culture auto-inductible ZYP5052 [Studier, 2005] et la surexpression a été contrôlée dans le lysa bactérien par SDS-PAGE. Ces analyses par SDS-PAGE ne montrent pas de bandes dans la fraction soluble du lysat pour les mutants Arg326Ala, Cis320Ala, Asp322Ala et Glu415Ala. Ces mutants sont peut-être instables. Les protocoles de lyse ou de purification utilisés devront être optimisés pour eux, en modifiant par exemple les concentrations en sel et en ajoutant du vanadate dans le tampon de lyse.

Les 16 protéines mutantes solubles sont donc produites dans un plus grand volume de milieu de culture auto-inductible ZYP5052, puis les protéines recombinantes sont purifiées par chromatographie d'affinité. Le rendement de purification est variable entre les mutants. Ainsi le mutant Phe353His est fortement surexprimé et purifié en grande quantité (**Figure IV.58-A**). D'autres mutants comme Trp321Arg ou Ser358Ala sont exprimés avec un faible rendement et nécessitent plusieurs purifications successives, afin d'obtenir les quantités de protéines nécessaires pour les analyses suivantes (**Figure IV.58-B**).

Figure IV.58 - Purification des mutants Zg-VIP01 Phe353His (A) et Ser358Ala par chromatographie d'affinité. L'absorbance à 280 nm de l'éluât est représentée en bleu et le pourcentage en tampon d'éluât est quant à lui représenté en vert.

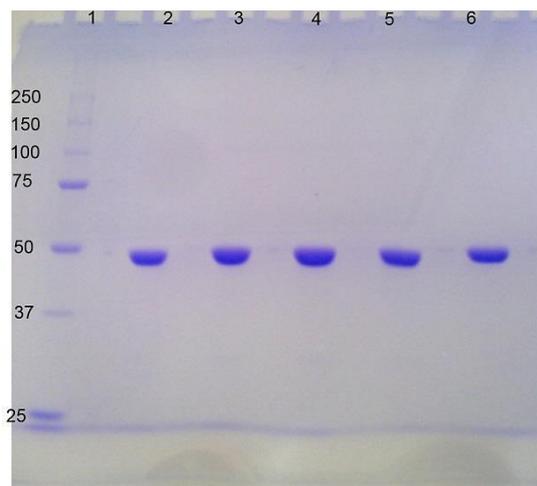


Comme de nombreuses purifications ont été menées en parallèle, nous avons choisi de ne recueillir que les fractions qui semblent pures lors de l'analyse par SDS-PAGE, c'est-à-dire sans contamination visible. En effet, la présence de protéines contaminantes nous obligerait à réaliser une seconde purification, par chromatographie d'exclusion de taille, ce qui nécessiterait beaucoup plus de temps. Les fractions les plus pures ont donc été regroupées, concentrées puis dialysées contre le tampon final (Tris HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 50 mM). Après cette étape, la pureté des protéines est contrôlée par SDS-PAGE et DLS (**Figure IV.59**). En tout, douze mutants ont été

purifiés en quantité suffisante pour permettre l'analyse de leurs propriétés enzymatiques et pour certaines des études structurales.

Figure IV.59 - Contrôle de la pureté des protéines mutantes de Zg-VIPO1. Exemple du contrôle de la pureté par SDS-PAGE (A) des protéines Zg-VIPO1 WT (2), Tyr263Ala (3), His360Ala (4), Phe353His (5) et Ser358Ala (6) et par DLS (B) des protéines mutantes Tyr263Ala et Phe353His

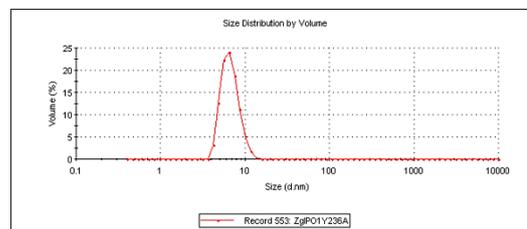
A



B

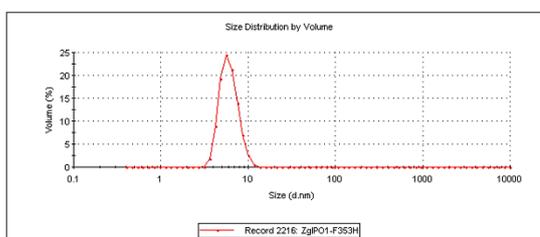
Tyr263Ala

	Diam. (nm)	% Volume	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 16,3	Peak 1: 157	0,1	177
PdI: 0,777	Peak 2: 6,78	99,9	1,67
Intercept: 0,971	Peak 3: 0,00	0,0	0,00



Phe353His

	Diam. (nm)	% Volume	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 12,7	Peak 1: 6,13	99,9	1,50
PdI: 0,521	Peak 2: 57,3	0,1	22,0
Intercept: 0,945	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

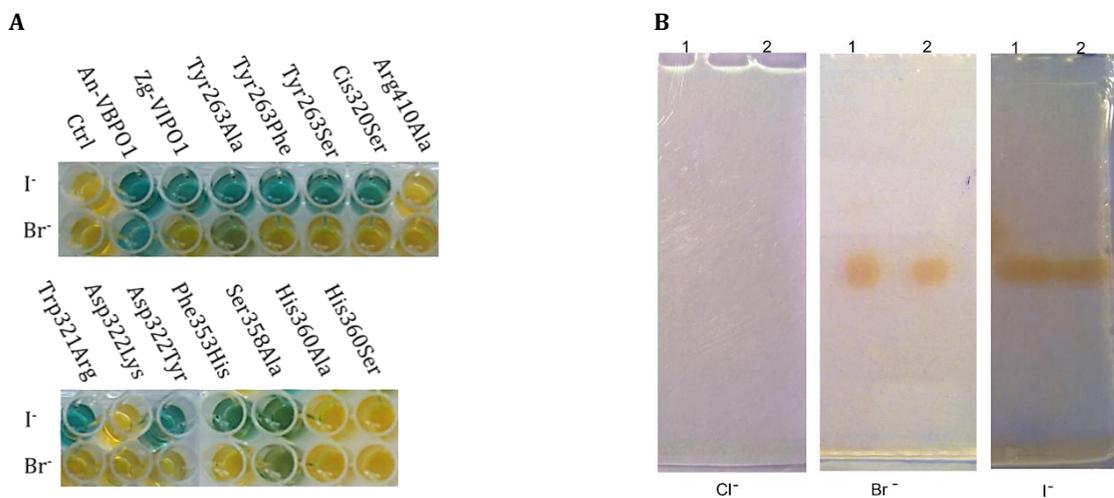


5 Analyses enzymatiques des mutants de Zg-VIPO1

5.1 Crible de la spécificité des mutants de Zg-VIPO1

Les spécificités des douze enzymes mutantes sont analysées à l'aide du test enzymatique fondé sur l'halogénéation du bleu de thymol. Pour quatre mutants (Arg410Ala, Asp322Lys, His360Ala et His360Ser) aucune activité iodo- et bromoperoxydase n'a été observée (**Figure IV.60-A**). Deux mutants, Tyr263Ala et Ser358Ala présentent quant à eux une faible activité bromoperoxydase. Pour les autres mutants, aucun changement de spécificité n'a été observé. Les tests enzymatiques fondés sur l'halogénéation de l'*o*-dianisidine avec ces deux derniers mutants ne montrent aucune activité chloroperoxydase après 4h d'incubation en présence de peroxyde d'hydrogène et de chlorure (**Figure IV.60-B**). A l'inverse, en présence de bromure une coloration orange est observée après 4h d'incubation. En présence d'iodure, cette halogénéation apparait en moins de 10 minutes.

Figure IV.60 - Crible de la spécificité des mutants de Zg-VIPO1. (A) La spécificité des mutants a été testée à l'aide du test spectrophotométrique fondé sur le bleu de thymol en présence d'iodure ou de bromure. Les réactions ont été réalisées à température ambiante. La coloration bleu/vert du milieu réactionnel indique une réaction d'halogénéation du substrat. (B) La spécificité des mutants Ser358Ala (puits 1) et Tyr263Ala (puits 2) a été testée à l'aide du test fondé sur l'*o*-dianisidine en présence d'iodure, de bromure et de chlorure. Le temps d'incubation en présence d'iodure est de 10 minutes et de 4h en présence de bromure et de chlorure. Les réactions ont été réalisées à température ambiante. La coloration orange/brun du gel de polyacrylamide indique une réaction d'halogénéation de l'*o*-dianisidine.



Les mutants Tyr263Ala et Ser358Ala sont très différents de par la localisation de leurs mutations. Pour le mutant Ser358Ala, la mutation se situe dans le site actif. Chez Ld-VIPO1, il a été proposé que la substitution de la sérine présente dans le site actif d'An-VBPO1 en alanine chez Ld-VIPO1 participe au changement de spécificité entre ces deux enzymes [Colin *et al.*, 2005]. De plus, ce même mutant produit chez Ci-VCPO présente une diminution de l'activité chloroperoxydase [Tanaka *et al.*, 2003b]. Ici, au contraire, la mutation élargit la spécificité de Zg-VIPO1 pour les halogénures avec l'apparition d'une activité bromoperoxydase.

La seconde mutation, Tyr263Ala, induit aussi une activité bromoperoxydase, mais pas une activité chloroperoxydase. Ce résidu est localisé sur la boucle présente à l'entrée du site actif, mais aucune des deux autres mutations de cette tyrosine ne confère une activité VBPO aux mutants. Les mécanismes à l'origine du changement de la spécificité ne sont pas clairs. La mutation Tyr263Ala pourrait modifier la configuration de la boucle ou augmenter l'agitation de cette dernière. Cette mobilité de la boucle pourrait perturber le pont salin présent entre l'acide aspartique et l'Arg410 (Figure IV.56-A). Une seconde hypothèse possible serait que la tyrosine filtrerait l'iodure et bloquerait l'accès du site actif aux autres halogénures plus électronégatifs. La mutation en alanine permettrait d'annuler cette propriété, alors que les mutations en des résidus polaires tels qu'une sérine ou une histidine permettraient de la conserver. Il se peut également que la boucle ne joue pas de rôle direct dans le contrôle de la spécificité.

Les résidus Tyr263 et Ser358 pourraient donc être impliqués dans le contrôle de la spécificité. Néanmoins l'activité bromoperoxydase reste très faible chez ces deux mutants qui ne présentent pas d'activité chloroperoxydase. Donc pour compléter ces hypothèses il sera intéressant de produire un double mutant de Zg-VIPO1 avec ces deux mutations, et d'obtenir la structure fine autour du vanadate pour les mutants Ser358Ala et Tyr263Ala. Les résultats obtenus avec le mutant Ser358Ala de Zg-VIPO1 montrent clairement que le rôle de ce résidu conservé peut différer de celui présent chez Ci-VCPO.

5.2 Caractérisation des paramètres catalytiques des mutants de Zg-VIPO1

Afin de déterminer les paramètres cinétiques des douze mutants de Zg-VIPO1, des études enzymatiques ont été entreprises à l'aide du test spectrophotométrique fondé sur le bleu de thymol. Les paramètres cinétiques calculés pour ces mutants sont présentés dans la **Table IV.12**. Des tests enzymatiques ont aussi été réalisés en présence de bromure pour les mutants Tyr263Ala et Ser358Ala. Cependant l'activité bromoperoxydase étant très faible il n'a pas été possible de déterminer de constantes catalytiques pour ces deux enzymes.

Table IV.12- Paramètres cinétiques des mutants de Zg-VIP01 déterminés à l'aide du test enzymatique fondé sur le bleu de thymol, à pH 7,2 et 25°C. [I]_{inh} : Concentrations en iodure pour lesquelles une inhibition des enzymes est observée.

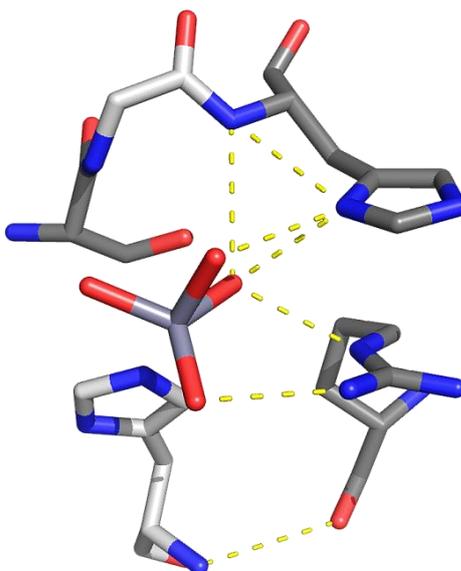
Mutant	K_m			k_{cat}			k_{cat}/K_m		[I] _{inh} mM
	mM	+/-	%	s ⁻¹	+/-	%	s ⁻¹ .mM ⁻¹	%	
WT	0.22	0.01	100	1.98	0.05	100	9.00	100	0.5
Tyr263Ala	0.44	0.17	203	3.53	0.25	178	8.02	88	2
Tyr263Phe	0.79	0.07	364	2.67	0.08	134	3.38	36	0.5
Tyr263Ser	1.58	0.30	730	13.97	2.43	705	8.83	96	0.26
Trp321Arg	0.39	0.11	177	1.78	0.22	89	4.56	50	1
Phe353H	2.63	0.53	1212	53.27	10.77	2689	20.29	222	0.5
Ser358Ala	0.19	0.06	87	2.19	0.07	110	11.54	126	2
His360Ala	0.02	0.01	9	0.01	0.0003	0.4	0.40	4	-
His360Ser	0.05	0.08	25	0.002	0.001	0.1	0.04	0.5	-
Arg410Ala	3.45	1.07	1592	0.03	0.01	1.5	0.01	0.1	-
Cis320Ser	0.91	0.28	418	2.76	0.87	139	3.05	33	0.5
Asp322Lys	1.38	0.43	635	3.86	1.1	195	2.81	31	0.5
Asp322Tyr	0.03	0.03	14	0.0007	0.0006	0.04	0.023	0.25	-

L'analyse des résultats des trois mutants de la Tyr263 montre des modifications des paramètres catalytiques (K_m et k_{cat}). Chez ces trois mutants, ces constantes sont respectivement 2 à 7 fois plus importantes pour le K_m et de 1,3 à 7 fois plus grandes pour le k_{cat} (**Table IV.3**). La mutation Tyr263Ser présente les modifications du K_m et k_{cat} les plus importantes, mais son rapport k_{cat}/K_m est peu changé du fait que les constantes catalytiques sont toutes les deux augmentées d'un facteur 7. De plus, ce mutant montre aussi une très grande sensibilité à l'inhibition par l'iodure. A l'inverse, la mutation de la Tyr263Ala diminue la sensibilité à l'iodure de l'enzyme, par rapport au type sauvage (WT). Ces résultats montrent que la tyrosine de la boucle a clairement un impact dans le cycle catalytique. Ce résidu peut perturber l'accès au site actif du peroxyde d'hydrogène et de l'halogénure. Cependant ce résidu semble aussi favoriser l'affinité de l'enzyme pour l'iodure par un mécanisme qui reste encore inconnu puisque sa mutation induit une diminution de celle-ci.

La mutation de l'histidine catalytique His360 en alanine ou sérine et celle de l'Arg410 en alanine provoquent dans les trois cas une perte d'activité de l'enzyme. Ces deux résidus forment respectivement 4 et 2 liaisons hydrogène avec les oxygènes du vanadate (**Figure IV.61**). Leurs mutations en alanine ou serine peuvent provoquer la rupture de ces liaisons pouvant être à l'origine de la perte d'activité. La perte d'activité lors de la mutation de ces résidus a déjà été rapportée plusieurs fois dans la littérature [Macedo-Ribeiro *et al.*, 1999b; Hemrika *et al.*, 1999; Renirie *et al.*, 2000b]. Ces deux résidus His360 et Arg410 sont donc nécessaires à l'activité catalytique de l'enzyme, cependant ils ne sont sans doute pas à l'origine des mécanismes

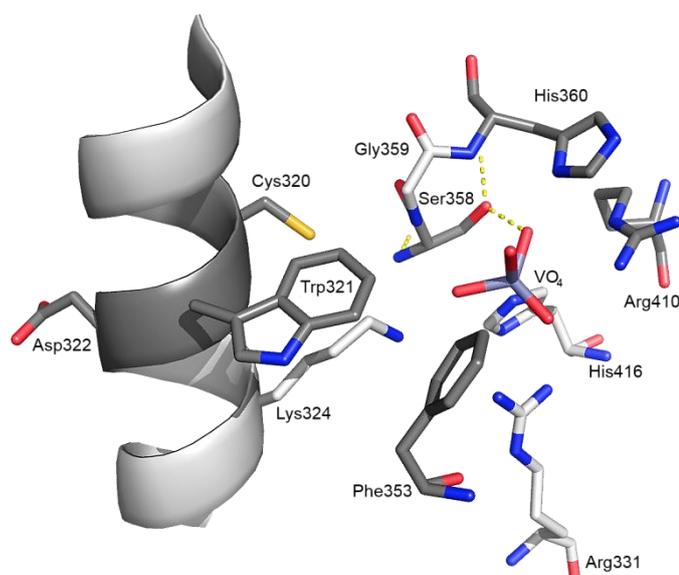
contrôlant la spécificité. La disparition des liaisons hydrogènes avec les oxygènes du vanadate peut provoquer des modifications du potentiel redox du vanadate ou bien une protonation des oxygènes supprimant la capacité de l'enzyme à oxyder un halogénure. Une autre hypothèse serait que la rupture des liaisons hydrogènes entraînerait une mauvaise orientation du vanadate dans le site actif, l'empêchant d'oxyder les halogénures.

Figure IV.61 - Réseau de liaison hydrogène entre His360, l'Arg410 et le vanadate chez Zg-VIPO1.



Les trois mutations dans la seconde sphère de coordination du vanadate n'ont pas engendré des modifications de spécificité de l'enzyme. Cependant le mutant Asp322Tyr présente une perte d'activité alors que le second mutant Asp322Lys montre une diminution de 70% de l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) (**Table IV.12**). Ce résidu se situe sur la même boucle que le Trp321 et la Lys324, présents dans le site actif (**Figure IV.62**) et forme des liaisons hydrogènes au niveau de la chaîne carbonée. La mutation Asp322Tyr mime l'enzyme An-VBPO1 et le second mutant Asp322Lys la VCPO isolée de *C. inaequalis*. Ce résidu est exposé à la surface de la protéine chez Zg-VIPO1 et Ci-VCPO. Cependant chez An-VBPO1, ce résidu est enfoui et se situe à l'interface entre les deux homodimères. La mutation Asp322Tyr génère donc une exposition en surface d'un résidu hydrophobe. La perte d'activité de ce mutant peut être due à l'enfouissement de ce résidu, perturbant l'hélice α comportant les résidus Trp321 et Lys324. De la même manière, la mutation Asp322Lys provoque une diminution de l'activité de l'enzyme provoquée par une perturbation cette hélice α . Les résultats obtenus à partir de ces deux mutants suggèrent l'importance de l'orientation des résidus du site actif dans l'activité enzymatique.

Figure IV.62- Représentation du site actif de Zg-VIPO1 et de l'hélice α comportant les résidus Trp321 et Lys324. Les résidus mutés sont représentés en bâtonnets et les atomes de carbone sont colorés en gris foncé. Les résidus présents dans le site actif sont représentés en bâtonnets et les atomes de carbones sont colorés en blanc.



La mutation Cys320Ser se situe aussi sur l'hélice comportant les résidus Trp321 et Lys324 (**Figure IV.62**). La mutation de ce résidu en sérine induit une diminution importante de la constante d'affinité pour l'iodure. Chez An-VBPO1 et Ci-VCPO le résidu présent à la même position de la Cys320^{Zg-VIPO1} est substitué par une sérine chez ces enzymes et forme une liaison hydrogène avec la lysine présente dans le site actif. Les résidus sérine et cystéine sont très proches au niveau stérique. Par conséquent, on peut présager que la mutation n'induit pas de modification structurale importante de l'hélice. Mais la substitution de la cystéine en sérine peut entraîner la création d'une nouvelle liaison hydrogène avec la lysine (Lys324^{Zg-VIPO1}). Celle-ci pourrait perturber l'affinité de l'enzyme pour l'iodure, et/ou diminuer la réactivité de l'enzyme, en modifiant la liaison hydrogène entre le vanadate et la lysine.

Dans le site actif, le résidu Trp321 est conservé chez Ci-VCPO et An-VBPO1, alors que chez les deux bromoperoxydases d'algues rouges Cp-VBPO et Co-VBPO, il est substitué par une arginine. La mutation Trp321Arg chez Zg-VIPO1 n'induit aucun changement de spécificité, mais la constante d'affinité (K_m) est deux fois plus importante que celle du WT. A l'inverse, la constante catalytique (k_{cat}) est légèrement diminuée (11 %). Ce résidu semble donc jouer un rôle dans l'affinité pour l'iodure. Cependant, chez *C. pilulifera* et *G. changii* la mutation de l'arginine, respectivement en tryptophane [Ohshiro *et al.*, 2004] et en phénylalanine [Baharum *et al.*, 2013] induit l'émergence d'une faible activité chloroperoxydase. Néanmoins dans la seconde étude les auteurs n'excluent pas une contamination du chlorure de potassium par du bromure. La présence du tryptophane pourrait favoriser la liaison de tous les halogénures dans le site actif et expliquerait pourquoi le

mutant Trp321Arg présente une diminution d'affinité pour l'iodure. En effet, les constantes d'affinités chez Co-VBPO, Cp-VBPO et Gc-VBPO1 sont plus grandes pour le bromure [Itoh *et al.*, 1986; Sheffield *et al.*, 1992; Baharum *et al.*, 2013] que celles caractérisées chez An-VBPO1, An-VBPO2 et Ld-VBPO1 [Colin *et al.*, 2005; Verhaeghe *et al.*, 2008a; Wischang *et al.*, 2012] (cf. Tableau I.4). En conclusion, la présence d'un résidu positif pourrait favoriser la liaison de l'halogénure à l'image de ce qu'avait déjà proposé Messerschmidt et Wever [1996].

La phénylalanine présente chez Ci-VCPO et Zg-VIPO a été proposé comme étant à l'origine des différences de spécificité entre les VCPO et les VBPO [Hemrika *et al.*, 1999]. Chez Zg-VIPO1, la Phe353 a été mutée en histidine afin de mimer le site actif d'An-VBPO1. Cette mutation n'induit pas de changement de spécificité mais provoque par contre des changements importants des constantes catalytiques. Les valeurs du K_m et k_{cat} sont augmentées respectivement d'un facteur 12 et 26, et l'efficacité catalytique est augmentée d'un facteur 2. A l'inverse la mutation de la Phe397 en histidine chez Ci-VCPO entraîne une diminution des K_m et k_{cat} pour le bromure et le chlorure [Tanaka *et al.*, 2003b]. L'effet de ces mutations est donc très différent chez deux enzymes ayant pourtant un site actif similaire. Ces résultats montrent donc que malgré l'homologie au niveau des résidus du site actif, le potentiel électrochimique du vanadate chez Ci-VCPO et Zg-VIPO1 pourraient être très différents et être à l'origine de la différence de spécificité entre ces deux enzymes. Bien qu'il soit possible qu'un autre résidu joue aussi un rôle dans la spécificité, il est essentiel d'obtenir des informations sur la structure fine du vanadate chez Zg-VIPO1 afin de la comparer avec celle obtenue pour Ci-VCPO (cf. **partie 6.1**).

La mutation Ser358Ala chez Zg-VIPO1 modifie la spécificité mais n'engendre pas de modifications significatives des constantes catalytiques vis-à-vis de l'iodure (K_m et k_{cat}). Malgré le fait que ce résidu soit conservé dans la majorité des VBPO et qu'il semble former une liaison hydrogène avec un oxygène équatorial du vanadate, il n'est pas crucial pour l'activité des VBPO. Une mutation similaire chez Ci-VCPO (Ser402Ala) provoque une diminution importante du k_{cat} en présence de chlorure ou de bromure, et ne modifie pas l'affinité de l'enzyme pour le chlorure et le bromure [Tanaka *et al.*, 2003b].

La comparaison de nos résultats avec ceux publiés précédemment avec les mutants de Ci-VCPO et Co-VBPO, révèle que la fonction d'un seul résidu semble parfois très différente d'une enzyme à l'autre, et nous conduit à émettre les hypothèses suivantes. Dans la plupart des cas, la mutation d'un résidu dans le site actif entraîne une modification abaissant le plus souvent le potentiel d'oxydoréduction du vanadate et diminue la capacité de l'enzyme à oxyder un

halogénure plus électronégatif (diminution de la spécificité de VCPO vers VBPO), ou même supprime cette aptitude (perte de l'activité). Nous proposons donc que l'ensemble des résidus constituant le site actif forme un équilibre qui peut moduler la spécificité des VHPO, en faisant varier le potentiel d'oxydoréduction du vanadate. L'équilibre des charges présentes dans le site actif et la force des différentes liaisons hydrogènes entre ces résidus et les oxygènes du vanadate travaillent de concert pour réguler finement non seulement le cycle catalytique, mais aussi la spécificité de ces enzymes.

6 Etudes structurales de Zg-VIPO1 et de deux mutants

6.1 Cristallogenèse des mutants Phe353His et His360Ala de Zg-VIPO1

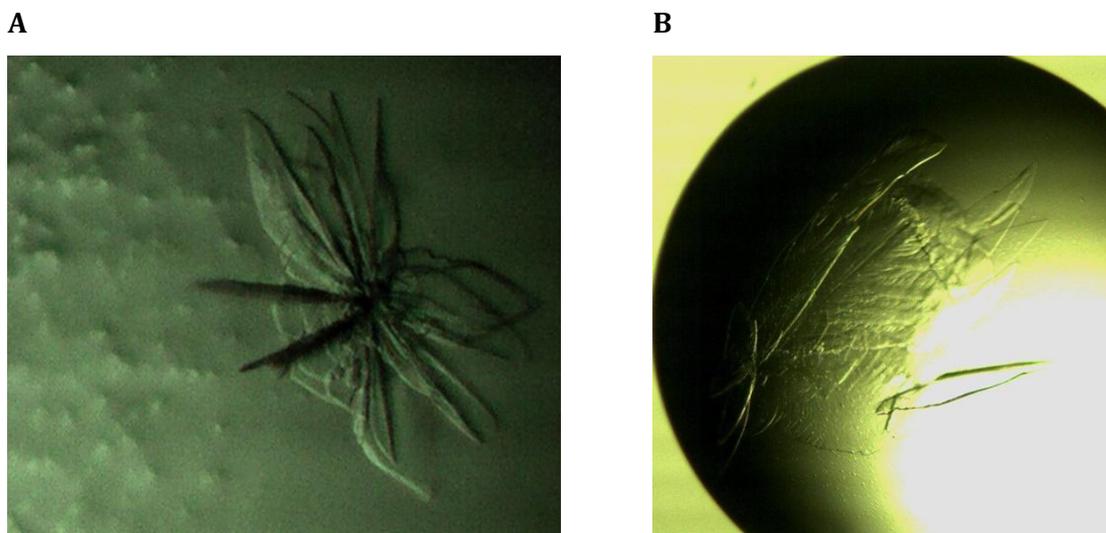
En parallèle à ces études enzymatiques, des tests de cristallogenèse ont été entrepris en vue de déterminer la structure des mutants Phe353His et His360Ala et observer l'impact des mutations sur la structure globale de la protéine. Ces deux mutants présentent des modifications d'activités très différentes et sont surexprimées de manière très importante. C'est pour ces raisons que nous avons décidé de mener ces expériences de cristallogenèse qui ont été réalisées sur la plateforme de cristallographie des protéines de la Station Biologique de Roscoff.

Pour le mutant de Phe353His, les meilleures conditions de cristallogenèse ont été obtenues dans des gouttes composées de 2 μ L de protéine (10,5 mg/mL) avec 1 μ L de tampon de cristallogenèse (citrate de sodium pH 4,6 0,1M, PEG 3500 20-26% et acétate de lithium 0,1 M) (**Figure IV.63-A**). Un jeu de données a été obtenu au synchrotron de Grenoble sur la ligne ID14-4. Cependant une analyse préliminaire des données de diffraction montre qu'il ne sera pas possible d'obtenir une structure tridimensionnelle avec une résolution inférieure à 3 Å. Nous avons donc décidé d'optimiser la cristallogenèse afin d'obtenir de nouveaux cristaux plus importants et des données de meilleures qualités.

Les meilleures conditions de cristallogenèse pour le mutant His360Ala ont été obtenues dans des gouttes composées de 2 μ L de protéine (15 mg/mL) avec 1 μ L de tampon de cristallogenèse. Ce dernier est composé d'HEPES pH 7,5 0,1M, PEG 2000 30-36%, de bromure de sodium 0,2 M et chlorure de lithium 0,15 M et représentait un volume de 500 μ L. Les cristaux sélectionnés (**Figure IV.63-B**) sont ensuite trempés dans une solution de cryo-protectant composée de la solution de cristallisation avec 10% de glycérol. Ils sont ensuite montés en boucle et congelés sous flux d'azote.

Comme pour le mutant Phe353His, un jeu de données de diffraction des rayons X a été obtenu au synchrotron de Grenoble sur la ligne ID14-4 et reste encore à traiter. L'analyse automatique préliminaire des données montre que le groupe d'espace est P 1 21 1 avec des paramètres de maille de taille 57,3 x 74,8 x 59,3 Å ($\alpha = 90,0$; $\beta = 113,6$; $\gamma = 90,0$) et d'une résolution de 100-2,08 Å.

Figure IV.63 - Cristaux des mutants His360Ala (A) et Phe353His (B) obtenus dans une goutte suspendue.



6.2 Détermination de la structure fine du vanadate chez Zg-VIPO1 et des mutants Phe353His et His360Ala

Les analyses structurales par diffraction des rayons X apportent des informations sur la structure globale de la protéine. La spectrométrie d'absorbance des rayons X (XAS) quant à elle permet d'obtenir des informations structurales d'une résolution environ 10 fois supérieure, et des informations sur l'état d'oxydation du vanadate. Auparavant, la structure fine du vanadate avait été obtenue pour An-VBPO1 et Ci-VCPO [Kostenko *et al.*, 2008; Renirie *et al.*, 2010]. La caractérisation de celle de Zg-VIPO1 permettra de mieux comprendre les différences de coordination du vanadate au sein de la protéine et de son intermédiaire réactionnel du type « peroxovanadate », qui pourraient expliquer la spécificité des enzymes.

Le spectre XAS au seuil K (couche électronique la plus profonde) du vanadium de la protéine Zg-VIPO1 recombinante reconstituée avec du vanadate a été obtenu une première fois sur la ligne SAMBA du synchrotron Soleil en septembre 2012 (Saclay, France). Les mêmes analyses ont été réalisées en incubant préalablement l'enzyme reconstituée avec du H₂O₂ à différentes concentrations, afin de former l'intermédiaire réactionnel stable. Plus récemment, de nouveaux

spectres ont été acquis pour ces échantillons, mais aussi pour trois mutants (Tyr263Ala, Phe353His, His360Ala) sur la ligne SAMBA en juillet 2013, puis sur la ligne DUBBLE du synchrotron de Grenoble en novembre 2013 (**Table 13**).

Table 13 - Liste des spectres au seuil K du vanadium acquis pour Zg-VIPO1 en solution sous la forme reconstituée (vanadate) ou après ajout d'H₂O₂ (peroxovanadate), ainsi que pour les mutants His360Ala, Phe353His et Tyr263Ala.

Echantillon	Ligne	Type d'acquisition	Nombre de spectre
Zg-VIPO1	SAMBA	EXAFS	16
		XANES	21
	DUBBLE	EXAFS	14
Zg-VIPO1 + 2 éq. H ₂ O ₂	SAMBA	EXAFS	10
		XANES	21
	DUBBLE	EXAFS	
Zg-VIPO1 + 4 éq. H ₂ O ₂	SAMBA	EXAFS	9
His360Ala	SAMBA	XANES	14
	DUBBLE	EXAFS	4
His360Ala + 4 éq. H ₂ O ₂	DUBBLE	EXAFS	15
Phe353His	SAMBA	EXAFS	9
Phe353His + 4 éq. H ₂ O ₂	DUBBLE	EXAFS	5
Tyr263Ala	DUBBLE	EXAFS	14
Tyr263Ala + 4 éq. H ₂ O ₂	DUBBLE	EXAFS	13 (K10) et 19 (K13)

Les profils des spectres XAS obtenus pour Zg-VIPO1 et les mutants His360Ala, Phe353His et Tyr263Ala sous la forme recombinante (« vanadate ») et après ajout d'H₂O₂ présentent certaines variations dans la région XANES (**Figure IV.64**). Le spectre XANES obtenu avec Zg-VIPO1 en présence de deux équivalents de peroxyde d'hydrogène présente un profil chimère entre celui obtenu sans H₂O₂ ou en présence de quatre équivalents d'H₂O₂. Il semble donc que deux équivalents molaires d'H₂O₂ ne suffisent pas à convertir totalement le vanadate présent dans le site actif en peroxovanadate. Par contre, l'ajout de quatre équivalents molaires d'H₂O₂ modifie complètement le profil du spectre, en comparaison à la forme vanadate de l'enzyme, suggérant la formation du complexe peroxovanadate stable au sein de l'enzyme (**Figure IV.64**).

Les variations d'intensité du pré-seuil, du seuil et leurs décalages d'énergie par rapport à une feuille de vanadate sont listées dans la **Table IV.14**. L'analyse de ces variations permet de connaître l'état d'oxydation du vanadium. Les paramètres sont spécifiques d'un vanadium à l'état d'oxydation (V) dans des échantillons protéiques et ceux en présence ou non de peroxyde d'hydrogène [Wong *et al.*, 1984; Hallmeier *et al.*, 1986]. La conservation de l'état d'oxydation (V) sous la forme peroxovanadate a déjà été rapportée à plusieurs reprises dans la littérature [Arber *et al.*, 1989; Küsthardt *et al.*, 1993; Renirie *et al.*, 2010].

Figure IV.64 - Spectres XANES au seuil K du vanadium de Zg-VIPO1 en présence ou non de peroxyde d'hydrogène et des mutants Phe353His et His360Ala.

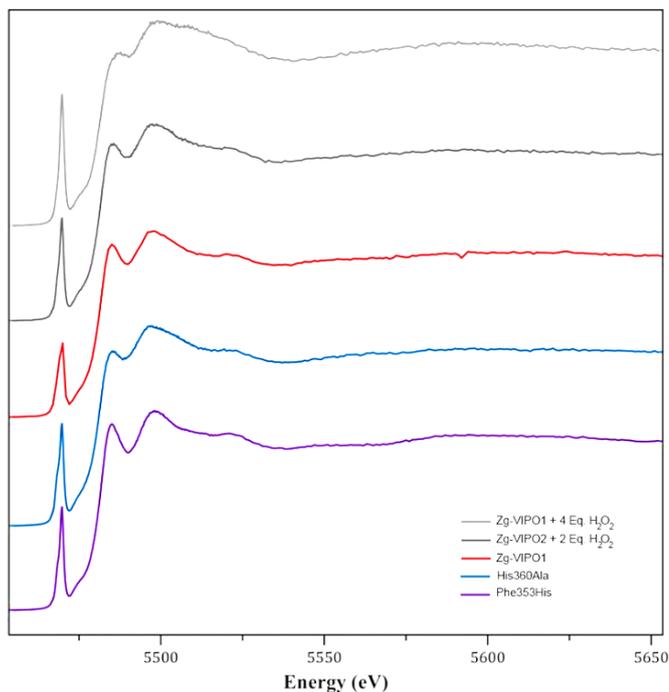
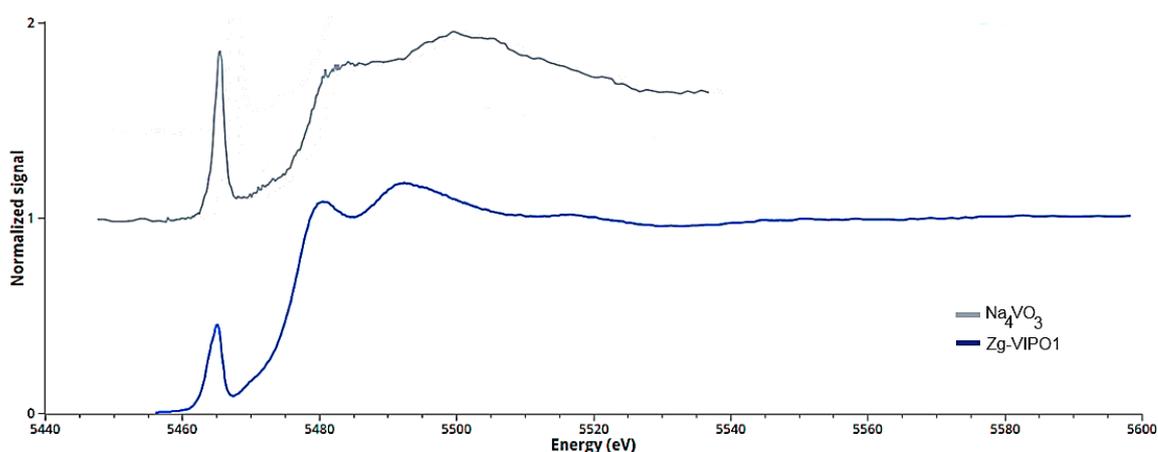


Table IV.14 - Caractéristique du pré-seuil et seuil K du vanadium obtenue pour Zg-VIPO1 pour la forme native et peroxovanadate. ΔE : décalage d'énergie du seuil K mesuré à la moitié de la hauteur du seuil par rapport au seuil K d'une feuille de vanadium. ΔPEF : décalage d'énergie du pré-seuil par rapport au seuil K d'une feuille de vanadium. I: intensité du pré-seuil exprimé en pourcentage par rapport à l'intensité du seuil. $V^{1/2}$: largeur du pré-seuil à mi-hauteur.

Echantillon	ΔE (eV)	ΔPEF (eV)	I	$V^{1/2}$ (eV)
Zg-VIPO1	8.0	5.0	0.43	2.7
Zg-VIPO1 + 2 Eq. H2O2	7.0	4.8	0.59	1.8
Zg-VIPO1 + 4 Eq. H2O2	7.0	4.8	0.78	1.8
Phe353His	7.0	4.8	0.55	1.3
His360Ala	7.0	4.8	0.58	1.5
Na3VO4	5.2	4.2	1.05	1.8

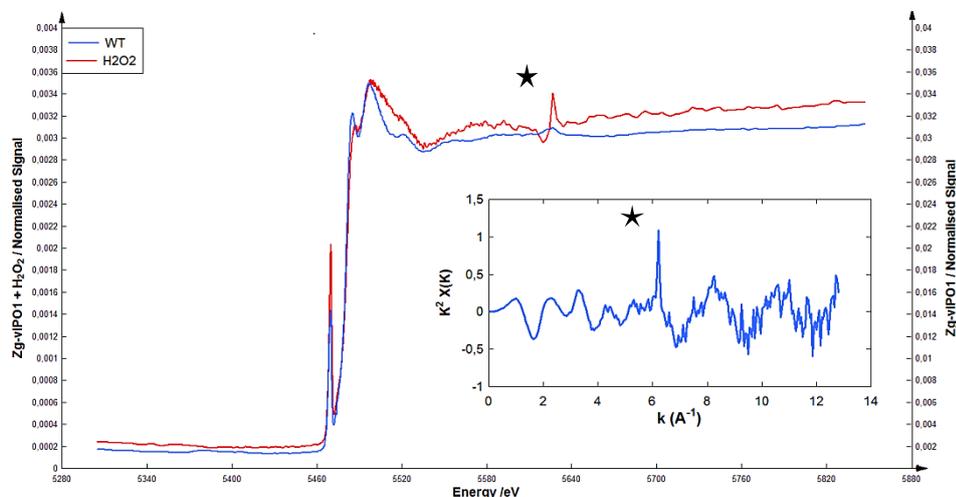
Le spectre XAS de Zg-VIPO1 au seuil K du vanadium présente un pré-seuil similaire à ceux observés pour An-VBPO1 et Ci-VCPO [Arber *et al.*, 1989; Küsthardt *et al.*, 1993; Kostenko *et al.*, 2008; Renirie *et al.*, 2010]. Celui-ci a été associé à la transition des électrons entre les orbitales électroniques 1s à 3d [Wong *et al.*, 1984]. Il est proposé que la différence d'intensité du pré seuil observée entre Zg-VIPO1 et la solution de Na₃VO₄ dépend des différences de coordination du vanadium dans ces deux conditions (**Figure IV.65** et **Table IV.14**) [Kostenko *et al.*, 2008; Renirie *et al.*, 2010].

Figure IV.65 – Comparaison des spectres XAS au seuil K du vanadium de Zg-VIPO1 et d'une solution de sodium orthovanadate à 5 mM.



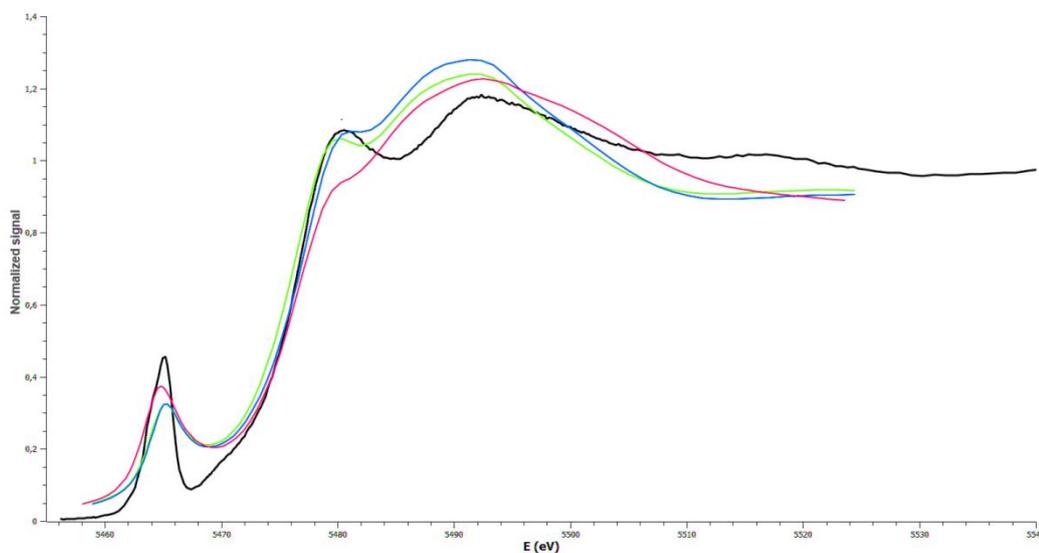
L'analyse de la région EXAFS des spectres obtenus lors des premières acquisitions sur la ligne SAMBA, révèle la présence de baryum dans les échantillons ou dans l'environnement. En effet le seuil K du vanadium se situe à 5465 eV et le seuil L2 du baryum se situe à 5624 eV. Ce pic d'absorbance du Ba perturbe, aux alentours de 6 Å, les oscillations EXAFS $k^2X(k)$ obtenues pour Zg-VIPO1 et la forme peroxovanadate de l'enzyme, les rendant inexploitable (**Figure IV.66**). La recherche de l'origine de la contamination a plus tard révélé la présence de Ba dans le cryostat utilisé.

Figure IV.66 - Spectre XAS au seuil K du vanadium de l'enzyme recombinante Zg-VIPO1 sous la forme native (WT, bleu) ou peroxovanadate (H2O2, rouge). Le spectre de la forme native et peroxovanadate ont été obtenus respectivement à des concentrations de 2 mM et 1,9 mM avec 4 mM d'H₂O₂. Dans l'encart, les oscillations EXAFS $k^2X(k)$ au seuil K du vanadium pondéré k^2 montre l'impact de la pollution par l'absorbance du Baryum dans les oscillations EXAFS. Le seuil L2 d'absorbance du Baryum est annoté par une étoile.



A partir des spectres XANES, il est possible de déterminer les distances interatomiques entre l'atome absorbeur et ceux liés par covalence. L'analyse de ce spectre a été menée en collaboration avec Pier Lorenzo Solari de Soleil et est basée sur la création de modèles 3D du vanadate. Puis à l'aide du logiciel FEFF v8 [Ankudinov *et al.*, 1998], les spectres théoriques XANES sont modélisés. Les premiers modèles 3D testés ont été basés sur les structures fines du vanadate établies pour An-VBPO1 [Kostenko *et al.*, 2008] et Ci-VCPO [Renirie *et al.*, 2010] (**Table IV.15**). La modélisation des spectres XANES théoriques pour ces deux modèles présente des profils significativement différents du spectre expérimental obtenu avec Zg-VIPO1 sous forme native (**Figure IV.67**). Ces premiers résultats montrent que les distances interatomiques entre ces trois enzymes sont très différentes, bien que la composition en acides aminés soit identique entre Zg-VIPO1 et Ci-VCPO.

Figure IV.67- Spectres XANES théorique modélisés à partir du modèle structural du vanadate chez Ci-VCPO (bleu), An-VBPO1 (rouge) et de la structure 3D du vanadate obtenue par diffraction des rayons X pour Zg-VIPO1 (vert), comparés au spectre expérimental obtenu pour Zg-VIPO1 (noir).



La modélisation d'autres spectres XANES théoriques a été entreprise afin de déterminer un modèle théorique pour Zg-VIPO1 sous la forme vanadate et peroxovanadate permettant d'interpréter au mieux les spectres expérimentaux. Afin de mieux comprendre l'impact de chaque liaison de covalence dans le spectre XANES, plusieurs dizaines de modèles 3D ont été construits. Dans chacun d'entre eux, quatre liaisons sur les cinq existantes ont été fixées et seule la longueur d'une seule liaison V-X a été modifiée allant de 1,5 Å à 2,0 Å à l'aide du programme Moldraw v2.0. Les spectres XANES modélisés sont superposés aux spectres expérimentaux (**Figure IV.68**). Cela nous a donc permis dans un premier temps d'observer l'impact de chaque liaison dans les différentes régions du spectre XANES. Ces premières modélisations ont montré que l'angle N-V-O_{apical} joue un rôle prépondérant dans l'intensité du pré-seuil. Plus de 230 modèles ont ainsi été analysés et les distances inter-atomiques des deux meilleurs modèles pour les formes vanadate et peroxovanadate sont présentés dans la **Table IV.15**. Les distances inter-atomiques sont différentes que celles observées par XAS pour les différentes VHPO. Chez Zg-VIPO, les longueurs des liaisons sont globalement plus importantes.

Figure IV.68 - Spectres XANES théoriques obtenus pour Zg-VIPO1 en modifiant la distance d'un oxygène équatorial de 1,5 Å à 2,0 Å. Les autres distances sont fixés à 1,8 Å V-O_{eq}, 1,9 Å V-O_{ap} et 2,0 Å V-N, N-V-O_{ap} 180°.

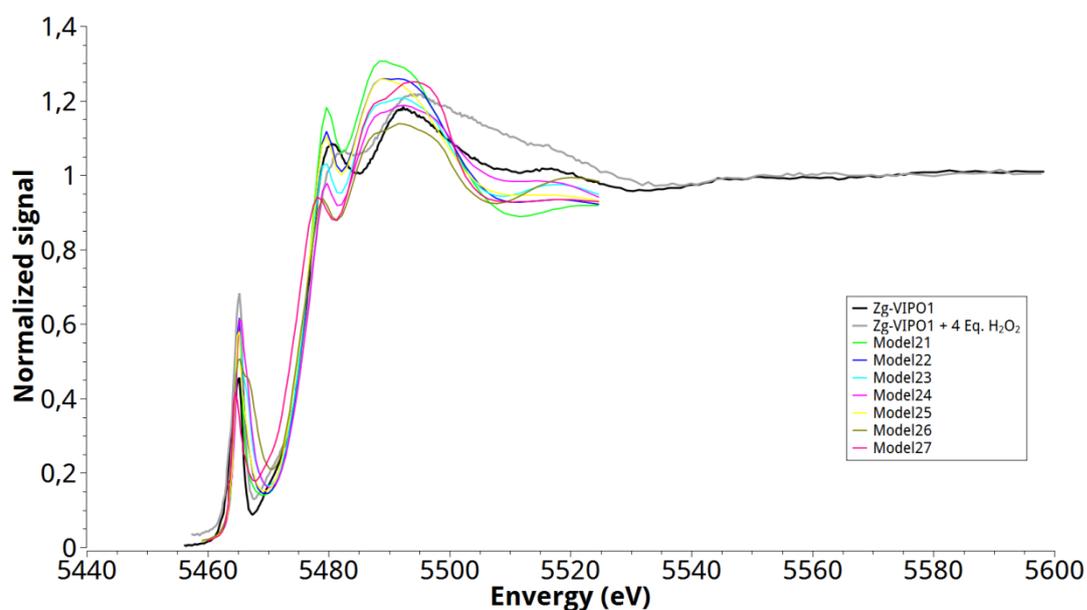


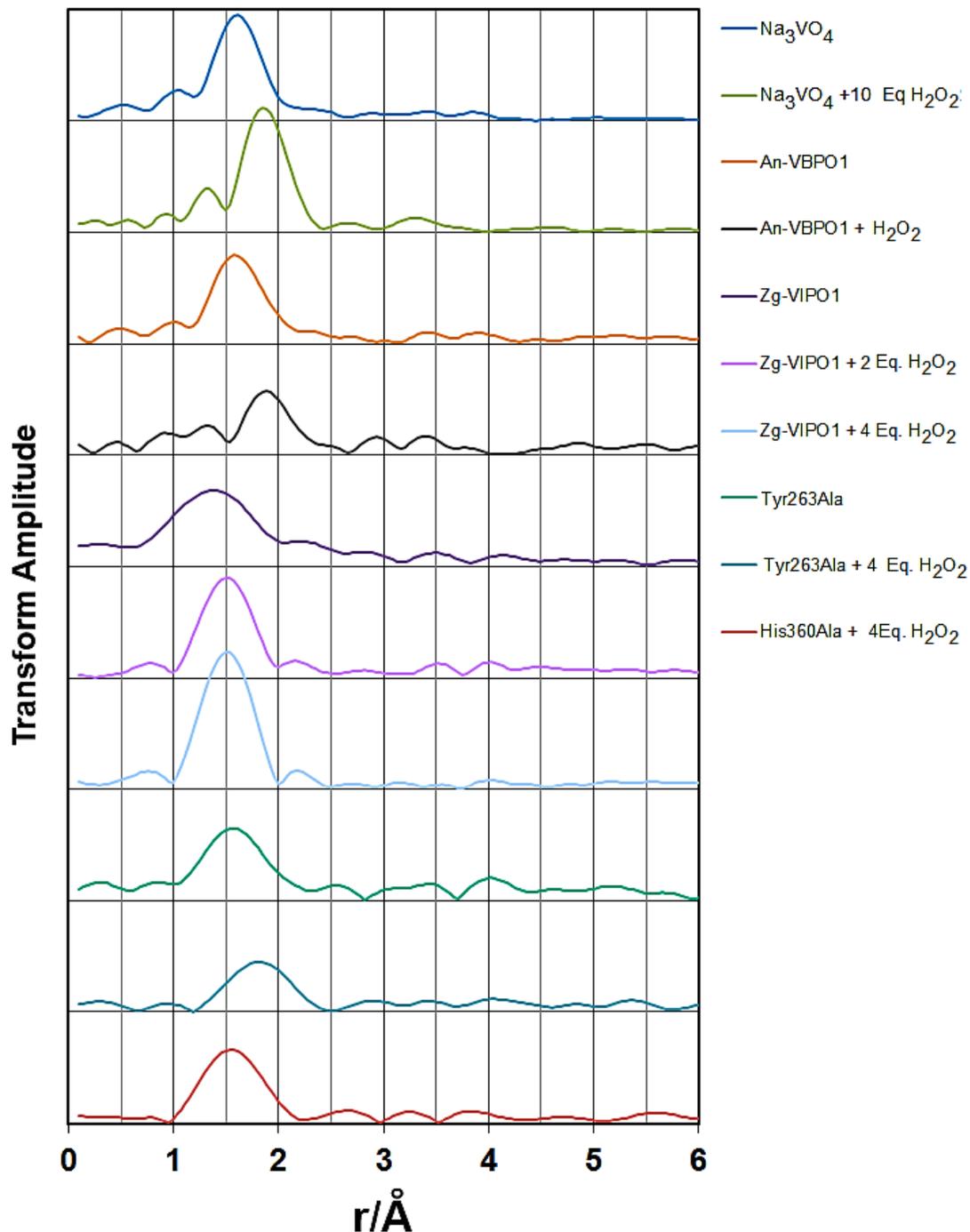
Table IV.15 - Distances interatomiques du vanadate de Zg-VIPO1, Ci-VCPO et An-VBPO1 et du peroxovanadate de Zg-VIPO1. Les distances sont données en Å et les angles en degré. ^a Renirie et al., 2010, ^b Arber et al., 1989.

Distances interatomiques	Zg-VIPO1		Ci-VCPO ^a		An-VBPO1 ^b
	vanadate	peroxovanadate	vanadate	peroxovanadate	vanadate
V-O _{eq}	1.60	1.70	1.54	1.54	1.61
V-O _{eq}	1.80	1.80	1.69	1.67	1.72
V-O _{eq}	1.80	1.80	1.69	1.67	1.72
V-O _{ap}	2.10	2.05	1.95	1.88	2.11
V-N	2.10	2.10	2.02	1.93	2.11
Angle N-V-O _{ap}	180	170	172	-	-

Les dernières acquisitions faites sur la ligne SAMBA et DUBBLE ont permis d'obtenir des spectres EXAFS de qualité pour Zg-VIPO1, mais aussi pour les trois mutants Tyr263Ala, Phe353His et His360Ala sous les formes vanadate et peroxovanadate. Les régions EXAFS obtenues ont été comparées aux spectres préalablement acquis pour An-VBPO1 au synchrotron de Hambourg et montrent clairement des distances interatomiques différentes chez ces différentes enzymes (**Figure IV.69**). On observe aussi une modification de ces distances lors du passage de la forme vanadate à la forme peroxovanadate chez Zg-VIPO1 et An-VBPO1. Ceci avait déjà été observé chez Ci-VCPO à la suite de la formation de la liaison peroxy entre un oxygène axial et un oxygène apical (**Table IV.15**) [Renirie et al., 2010]. Les données expérimentales obtenues pour les enzymes mutantes présentent des variations à la fois dans la région XANES du spectre et dans la partie EXAFS par rapport aux données obtenues pour l'enzyme Zg-VIPO1 WT. L'analyse complète des spectres XAS et la détermination des distances interatomiques restent encore à être réalisées afin de déterminer

la structure du vanadate chez ces enzymes. Ce travail est conduit en collaboration avec Martin Feiters (Université de Nijmegen, Pays Bas) et Pier Lorenzo Solari.

Figure IV.69- Transformés de Fourier d'An-VBPO1 et Zg-VIPO1 sauvage et mutantes sous la forme vanadate et peroxovanadate.



Les premières analyses des spectres XANES montrent clairement des changements de distances interatomiques entre le vanadium et les atomes liés de façon covalente lors de la formation du peroxovanadate, comme ce qui est observé chez les différentes VHPO étudiées. Ces

distances interatomiques restent encore à être déterminées précisément par l'analyse des spectres EXAFS acquis récemment. Les modèles structuraux proposés pour Ci-VCPO et An-VBPO1 ne permettent pas d'interpréter les spectres XANES obtenus pour la Zg-VIPO1. Ces résultats montrent que Zg-VIPO1 possède une coordination du vanadium différente des deux autres enzymes. Enfin, les résultats obtenus pour les trois mutants semblent aussi être différents de ceux obtenus pour Zg-VIPO1, montrant le rôle non seulement des résidus du site actif, mais aussi de ceux à l'extérieur sur la structure fine du vanadate. Ces résultats préliminaires sont très encourageants quant à la possibilité d'obtenir des informations structurales sur la coordination et la géométrie du vanadate au sein de Zg-VIPO1 et devront ensuite être comparés plus finement avec ceux obtenus chez Ci-VCPO et An-VBPO1.

7 Conclusions et perspectives

Une grande partie de mon travail de thèse a visé à comprendre les mécanismes moléculaires à la base de la spécificité chez les haloperoxydases à vanadium. Pour étudier ces mécanismes, ce travail se fonde sur l'étude de la première iodoperoxydase isolée de *Z. galactanivorans*. Étonnement cette enzyme partage avec la VCPO caractérisée chez *C. inaequalis* un site actif identique, de par sa composition et sa structure. Par conséquent, les mécanismes moléculaires qui contrôlent la spécificité pour les halogénures chez cette enzyme ne sont pas uniquement dépendants des acides aminés du site actif, ce qui contredit les hypothèses énoncées auparavant (cf. partie I.3.4.2).

L'analyse du réseau de liaisons hydrogènes autour du site actif a permis tout d'abord d'identifier de nouveaux résidus similaires chez les VHPO et d'affiner les domaines conservés dans cette famille enzymatique. Dans un second temps, elle a aussi permis de caractériser des résidus spécifiques de Zg-VIPO1 par rapport aux autres VHPO et qui peuvent donc être potentiellement des résidus responsables de la spécificité. Suite à cette analyse, 18 mutations ponctuelles ont été ciblées et l'analyse biochimique a été conduite pour 12 mutants.

La caractérisation biochimique de ces mutants a révélé que trois d'entre eux, His360Ala, His360Ser et Arg410Ala, présentaient une perte de l'activité haloperoxydase. Cette perte d'activité avait déjà été observée chez des mutants similaires chez Ci-VCPO [[Macedo-Ribeiro et al., 1999b](#); [Hemrika et al., 1999](#)]. Ces résidus forment de nombreuses liaisons hydrogènes avec le vanadate.

Leurs mutations pourraient alors conduire à une déstabilisation de la structure ou une mauvaise orientation du vanadate supprimant la capacité de l'enzyme à oxyder les halogénures.

La boucle présente à l'entrée du site actif joue aussi clairement un rôle dans l'activité de l'enzyme et semble contribuer partiellement aux mécanismes contrôlant la spécificité. En effet, la mutation Tyr263Ala induit une faible activité bromoperoxydase. Cependant il est difficile de savoir si ce changement de spécificité provient de la suppression de la fonction de la Tyr263 ou d'un effet indirect de la mutation. En effet, celle-ci pourrait perturber un pont salin entre un acide aspartique, situé à proximité de la Tyr263, et l'Arg410, présente dans le site actif. Enfin, une faible activité bromoperoxydase a aussi été identifiée pour le mutant Ser358Ala. Cette mutation a déjà été faite chez Ci-VCPO mais dans ce cas il a été observé une baisse de l'activité VCPO et VBPO. Ces résultats démontrent qu'un résidu identique chez deux enzymes au site actif homologue peut avoir une fonction différente puisque que la rupture de la liaison hydrogène entre la Ser358 et le vanadate a un effet différent de celui observé chez Ci-VCPO. Ces différences semblent indiquer que la fonction d'un résidu n'est pas suffisante pour expliquer les mécanismes contrôlant la spécificité. Il est donc nécessaire d'étudier ces mécanismes dans un modèle englobant les autres résidus du site actif, d'autant plus que certaines mutations chez Zg-VIPO1 induisent des changements des paramètres catalytiques très différents de ceux décrits auparavant pour des mutants similaires produits chez d'autres VHPO. Cependant la composition en acides aminés des sites actifs seuls ne permet pas non plus d'expliquer entièrement les mécanismes contrôlant la spécificité chez les VHPO. Il existe donc en plus un autre facteur, sans doute structural, qui permettrait de contrôler, en association avec la fonction des résidus du site actif, la spécificité des VHPO.

En parallèle à ces approches de mutagenèse dirigée, nous nous sommes intéressés à la coordination du vanadium dans le site actif de Zg-VIPO1 par la technique de XAS. L'étude vise à déterminer la structure fine du vanadate et du peroxovanadate au sein de la protéine. L'analyse préliminaire des données montre clairement des différences avec celles observées pour Ci-VCPO et An-VBPO1. Des modifications dans les distances inter-atomiques entre le vanadium et les oxygènes ou l'azote sont observables entre Ci-VCPO et Zg-VIPO1, bien que la composition et la structure 3D des sites actifs soient identiques. Ces résultats indiquent que des modifications fines dans le site actif, non observables par diffraction des rayons X, sont responsables de changements structuraux du vanadate et pourraient être à l'origine de la spécificité pour l'iode.

En conclusion, les résultats de cette étude montrent que la spécificité pour l'iode chez Zg-VIPO1 ne semble pas être contrôlée par un seul résidu mais par un équilibre créé par un ensemble

de résidus. Ce contrôle impliquerait tous les résidus du site actif, ainsi que certains présents au voisinage de celui-ci. Ces derniers pourraient induire des changements structuraux fins des résidus du site actif, en modifiant la force des liaisons hydrogènes qu'ils forment avec le vanadate. Nous proposons donc que des variations fines de la structure et/ou des changements de composition en acides aminés autour du site actif modifient le potentiel d'oxydoréduction du peroxovanadate et confèrent ainsi à l'enzyme la capacité d'oxyder des halogénures plus ou moins électronégatifs. En perspective, il serait intéressant de trouver un nouveau test enzymatique permettant d'étudier l'activité de l'enzyme sur une plus grande plage de pH. En effet, le test enzymatique fondé sur le bleu de thymol se limite à des pH compris entre pH 7 et 8. Ce nouveau test permettrait de caractériser l'activité de Zg-VIPO1 et 2 à différents pH et d'observer le rôle de la protonation sur leur activité. En outre, de nouveaux mutants de Zg-VIPO1 (simple ou double) pourront aussi être produits afin de confirmer l'hypothèse que les résidus présents à l'extérieur du site actif contribuent activement aux mécanismes de contrôle de la spécificité. Ainsi la Thr373 et la Ser377 pourraient être des cibles intéressantes à analyser. Il sera aussi intéressant de muter l'acide aspartique qui forme un pont salin avec l'arginine 410. D'autres mutations au voisinage de ce résidu pourront aussi être envisagées afin de modifier la configuration de l'acide aspartique et l'obliger à former soit un pont salin avec l'His360, soit deux ponts salins avec l'Arginine 410. Dans le premier cas, la mutation aura pour but de mimer ce qu'on peut observer chez les VBPO et dans le second cas, elle permettra de mimer ce qui est observé chez Ci-VCPO. De plus, l'obtention de la structure tridimensionnelle de Zg-VIPO2 permettra aussi de préciser les résidus pouvant être responsables de la spécificité chez les VIPO de *Z. galactanivorans*. Enfin, il sera nécessaire de poursuivre l'analyse des données XAS afin d'obtenir la structure du vanadate chez Zg-VIPO et les trois mutants. Ces structures fines permettront par la suite de débiter des analyses *in silico* par DFT ou QM/MM afin d'étudier le potentiel rédox du vanadate et du peroxovanadate chez Zg-VIPO1 et de les comparer à ceux de Ci-VCPO et An-VBPO1. Cette analyse permettra de vérifier si des potentiels d'oxydoréduction différents expliquent les différences de spécificité observées chez les VHPO.



ocalisation et spéciation de l'iode chez *Z. galactanivorans* et *L. digitata*

1 Etudes préliminaires de la localisation et spéciation de l'iode chez *Z. galactanivorans*

Des mesures préliminaires ont montré que *Z. galactanivorans* était capable de concentrer d'un facteur 10 environ, l'iode présent dans le milieu de culture (cf. partie I.2.2.2). La détermination de la localisation et de la spéciation de l'iode est importante afin de nous aider à comprendre les mécanismes impliqués dans sa métabolisation. Au cours de cette thèse, j'ai profité des collaborations mises en place, pour étudier la distribution et la spéciation de l'iode chez *L. digitata* et initier des travaux similaires chez *Z. galactanivorans*. Ce projet a été développé dans le cadre du programme ToxNuc-E et du projet KELPS soutenu par le programme NEEDS-Environnement.

1.1 Analyse de la spéciation de l'iode chez *Z. galactanivorans* par DESI-TOF

Dans la continuité de premières études menées avec *L. digitata*, nous avons initié des expériences, en collaboration avec l'équipe de Denis Doizi (DEN/DANS/DPC/SECR/LRMO, Saclay), et déterminer la forme chimique de l'iode *in vivo* chez *Z. galactanivorans*. Pour cette étude, il est nécessaire de conserver la spéciation de l'iode et sa localisation et donc, il est nécessaire d'utiliser une technique très sensible et la moins intrusive possible. Nous nous sommes donc tournés vers la technique de désorption-ionisation par électrobulbation couplée à la spectrométrie de masse du type temps de vol (DESI-TOF). Cette technique peu intrusive ne nécessite aucune préparation d'échantillon et permet l'étude de la spéciation de l'iode jusqu'à des concentrations de 500 μM . Des effets de condensation entre les ions iodures sont ensuite observés à des concentrations plus importantes.

Les premières mesures de DESI-TOF ont été menées sur des échantillons d'eau de mer évaporés à l'air libre sur une lame de verre. La concentration en iode étant très faible, cet élément n'a pas été détecté dans ces échantillons. Bien que la concentration de l'iode de l'eau de mer soit théoriquement supérieure au seuil de détection de cette technique, la présence de sels en forte concentration peut être à l'origine d'un effet de masquage du signal de l'iode. Il est néanmoins intéressant de ne pas détecter l'iode de l'eau de mer par DESI-TOF et éviter ainsi les problèmes de bruit de fond de l'environnement.

En parallèle, des mesures ont été menées sur des gouttes de cultures fraîches de *Z. galactanivorans* séchées ou de cultures préalablement lyophilisées. Les mesures n'ont pas permis d'observer clairement la présence d'iode dans ces échantillons. Ces résultats suggèrent que la sensibilité de la technique ne permet pas sa détection dans des échantillons ayant des concentrations inférieures à 2,5 μM , ni l'analyse de sa spéciation, sans doute à cause des effets de suppression de signal. Il sera intéressant de faire ce type de mesure sur une culture sur boîte de Pétri contenant du ZoBell et de l'agarose, afin de minimiser l'effet des sels.

1.2 Distribution et localisation de l'iode chez *Z. galactanivorans*

Aucune information n'existe quant à la localisation subcellulaire de l'iode chez *Z. galactanivorans*. La technique d'imagerie par nano-SIMS (Spectrométrie de masse à ionisation secondaire) permet une cartographie élémentaire avec une résolution spatiale proche de la centaine de nanomètres et rend cette technique applicable à l'imagerie chimique chez les bactéries. Pour tenter de localiser l'iode chez *Z. galactanivorans*, 6 μL d'une culture en milieu ZoBell ont été évaporés sur une lame en silicium. Puis l'échantillon a été soumis à un bombardement d'ions primaires. Les ions secondaires émis (O, CN, ^{32}S et ^{127}I) sont alors analysés par spectrométrie de masse. L'échantillon est balayé en 2D par le faisceau d'ions primaires ce qui permet de déterminer la répartition des éléments analysés dans l'échantillon. Les expériences préliminaires ont été menées avec l'équipe de Jean-Luc Guerquin-Kern (INSERM, U759, Orsay) mais elles n'ont pas permis d'obtenir d'images claires de *Z. galactanivorans*. En effet, le protocole de préparation des échantillons n'a pas permis d'obtenir des zones homogènes où l'on pouvait distinguer des cellules bactériennes isolées. Il sera donc nécessaire d'optimiser le protocole de préparation des échantillons afin d'obtenir la distribution de l'iode chez *Z. galactanivorans* par nano-SIMS.

Enfin, des analyses d'émission de rayon X induit par des particules chargées (PIXE) ont été entreprises sur des cultures cryofixées de *Z. galactanivorans* en milieu ZoBell. Ce travail a été mené en collaboration avec l'équipe de Richard Ortega du CENBG de Gradignan (UMR 5797) sur la plateforme AIFIRA. Malheureusement, ces essais n'ont pas permis d'observer la présence d'iode. Il est apparu que les dimensions de *Z. galactanivorans* sont inférieures à la résolution spatiale de cette technique. Cette technique n'est pas appropriée à l'analyse de nos échantillons bactériens.

Ces analyses préliminaires n'ont malheureusement pas permis d'obtenir des informations sur la localisation et la spéciation de l'iode chez *Z. galactanivorans*. Dans le futur, il sera intéressant de

poursuivre les études d'imagerie par nano-SIMS en optimisant le protocole de préparation des échantillons pour obtenir un spectre par DESI-TOF, et connaître la spéciation de l'iode chez cette bactérie.

2 Distribution et spéciation de l'iode chez *L. digitata*

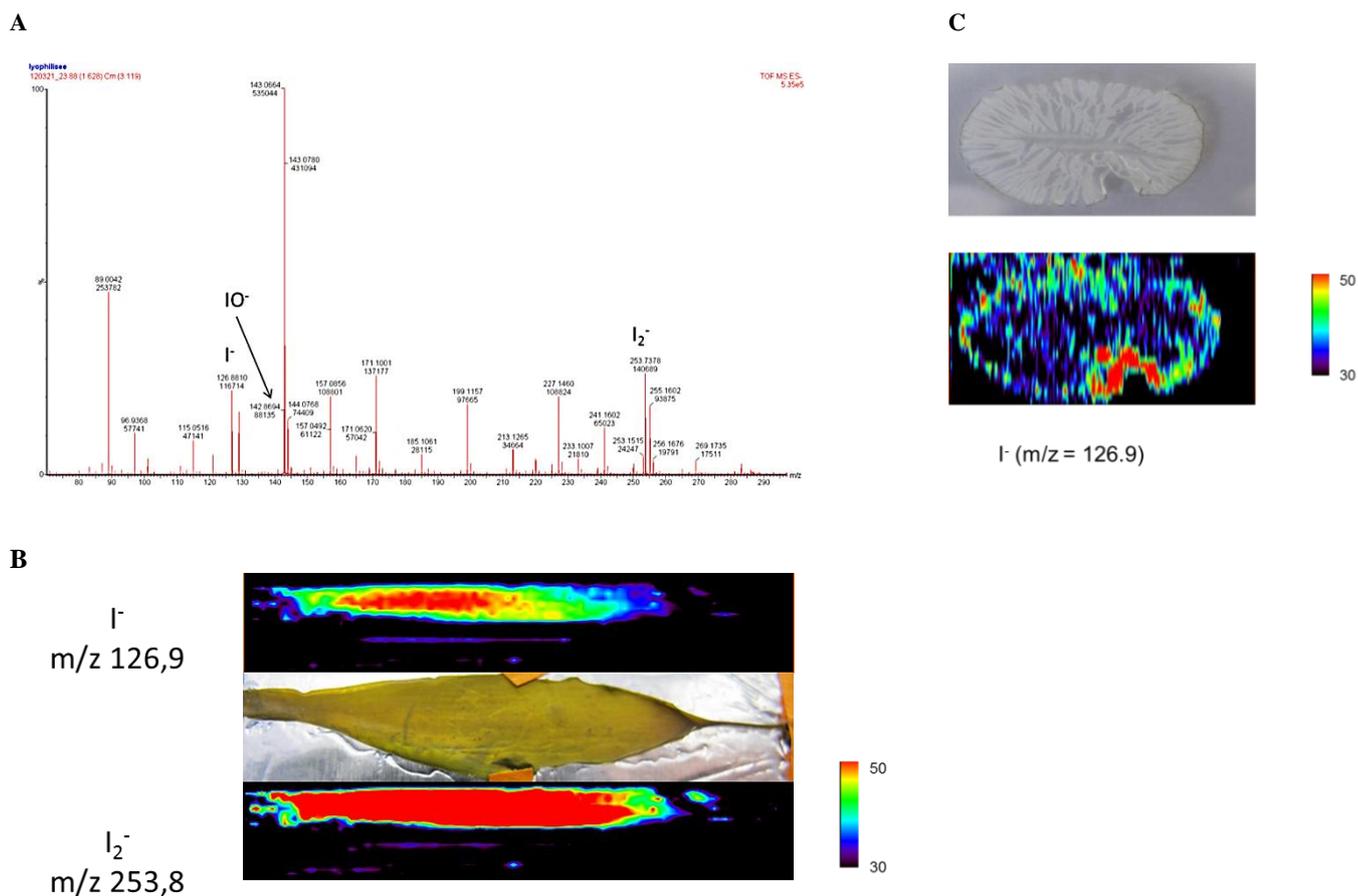
A l'inverse de *Z. galactanivorans*, la localisation de l'iode chez *L. digitata*, est connue et se situe principalement dans le compartiment extracellulaire pariétal sous la forme d'iodure (cf. **partie I.2.2.1**) [Verhaeghe *et al.*, 2008b; Küpper *et al.*, 2008]. Dans le contexte large du cycle de l'iode en milieu marin, le projet KELPS vise à analyser finement la spéciation chimique et la distribution de l'iode chez cette algue brune en combinant plusieurs approches d'imagerie chimique et de spectrométrie de masse. Ce projet vise à compléter certaines informations manquantes sur la spéciation et la distribution de l'iode dans différents tissus de *L. digitata* (en fonction de l'âge, de la localisation géographique Roscoff/Cherbourg)

2.1 Imagerie et spéciation chimique par spectrométrie de masse chez *L. digitata*

Dans le cadre du projet KELPS, des analyses par DESI-TOF ont été entreprises par Diane Lebeau (DEN/DANS/DPC/SECR/LRMO, Saclay) et par Nathalie Leroy au cours de son stage d'ingénieur, d'une part sur des plantules fraîches et des coupes transversales de stipes de *L. digitata* (**Figure V.70**), d'autre part sur des fragments de lames lyophilisées (résultats non présentés). Malgré des problèmes importants de déshydratation de *L. digitata* dû au solvant et à la température élevée dans l'enceinte, il a été possible d'obtenir des informations précises et reproductibles sur la spéciation de l'iode dans cette algue. Dans les différents organes et aux différents stades de développement, l'iode se retrouve majoritairement sous la forme I^- et I_2^- (**Figure V.70-A**). Du fait de la très forte concentration en iode dans cette algue, la présence d' I_2^- semble être due à la condensation des ions I^- dans le spectromètre de masse. En effet, la concentration en iode des plantules de *L. digitata* est supérieure à 70 mM [Küpper *et al.*, 1998], soit une concentration bien supérieure à celle où l'iodure se condense et forme l'iode I_2^- (0,5 mM). Néanmoins, ces résultats confirment que *L. digitata* concentre l'iode majoritairement sous la forme labile I^- [Küpper *et al.*, 2008]. Dans les différents échantillons l'espèce chimique IO^- est présente mais de façon moins importante. Cela suggère une oxydation partielle de l'iodure dans cette algue.

L'image partielle obtenue montre que l'iode semble être réparti sur la globalité de la surface de la plantule (**Figure V.70-B**). Enfin, les expériences menées sur une coupe transversale de stipe montrent que l'iode est réparti à la périphérie du stipe, majoritairement sous forme d'iodure (**Figure V.70-C**), corroborant ainsi les résultats de Verhaeghe et al. [2008b].

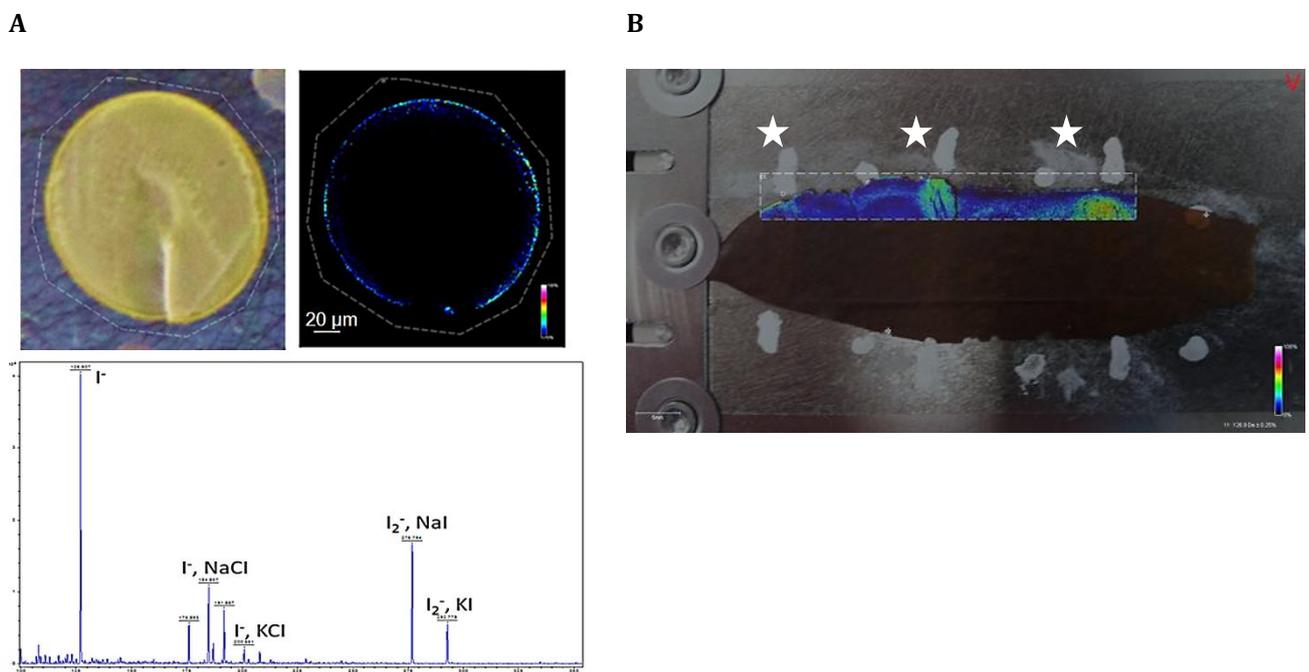
Figure V.70 - Analyse de la spéciation et de la répartition de l'iode chez *L. digitata*. (A) Spectre de masse obtenu par DESI-MS avec une plantule fraîche. (B) Image reconstituée à partir des spectres de masse représentant la répartition des ions I^- et I_2^- . La concentration d'iode est représentée par différentes couleurs (échelle dans la figure). (C) Image reconstituée à partir d'une coupe transversale de stipe provenant d'une algue adulte.



Du fait de la forte concentration en iode dans *L. digitata*, il est possible d'utiliser la technique de MALDI-TOF (Désorption ionisation laser assistée par matrice couplée à un spectromètre de masse à temps de vol), moins sensible que la technique précédente, mais qui possède une résolution spatiale plus importante. Elle permet aussi d'étudier la spéciation de l'iode dans l'échantillon. L'utilisation d'un vide poussé nécessite une préparation de l'échantillon pour le fixer au porte échantillon. Les résultats de l'analyse par MALDI-TOF montrent une distribution de l'iode en périphérie du stipe (**Figure V.71-A**) sous forme d'iodures. Des essais d'imagerie par MALDI-TOF ont aussi été réalisés sur une lame de plantule de *L. digitata*, stimulée par une solution

d'oligoguluronates. Ces éliciteurs de défense induisent une production locale et massive d'ERO et peuvent conduire à l'émission d'I₂ chez *L. digitata* (cf. **partie I.2.2.1**). Les régions mises en contact avec cette solution montrent une augmentation du signal iode en surface (**Figure V.71-B**). Cette technique ayant une intrusion dans l'échantillon de l'ordre de 0,1 à 20 µm suivant la puissance du laser, nous observons des variations de concentration en surface de l'algue. Ceci suggère la remobilisation, en surface des iodures stockés dans le méristoderme et de leur émission sous la forme I₂.

Figure V.71 - Distribution et spéciation de l'iode d'une section transversale de stipe d'un individu adulte (A) et sur la lame d'une plantule (B) de *L. digitata*. Les régions stimulées par des oligoguluronates sont notées par une étoile blanche sur la lame.



Ces analyses confirment que l'iode est stocké majoritairement en surface sous forme d'iodures chez *L. digitata*. De plus, les résultats préliminaires obtenus, suite à l'application d'un éliciteur de défense, montrent qu'il est possible d'utiliser l'imagerie par spectrométrie de masse pour étudier de façon très localisée la remobilisation de l'iode à la surface de l'algue.

2.2 Distribution chimique de l'iode par PIXE chez *L. digitata*

Afin d'obtenir la distribution tissulaire de l'iode chez *L. digitata* à partir de coupes de tissus dans différentes zones (lame, stipe, méristème) chez des plantules et des lames adultes ; des échantillons sont analysés simultanément, par RBS et par PIXE, sur la plate-forme AIFIRA de

Gradignan avec l'équipe de Richard Ortega afin de quantifier les éléments et obtenir des images élémentaires. Ces techniques permettent d'atteindre des résolutions suffisantes pour observer la distribution au niveau subcellulaire dans cette algue.

L'analyse révèle que l'iode est majoritairement concentré dans les tissus périphériques et plus particulièrement au niveau du méristoderme et du cortex, tout autant dans le stipe que dans la lame (**Figure V.72** et **Figure V.73**). Un gradient de concentration existe de l'extérieur vers l'intérieur. La distribution de l'iode est corrélée avec celle du carbone et correspond à la région apoplastique très riche en polysaccharides. Cette analyse complète les résultats obtenus précédemment chez *L. digitata* [Verhaeghe *et al.*, 2008b]. Le brome est, quant à lui, présent dans la couche extérieure du méristoderme du stipe. Sa distribution est plus diffuse dans la lame adulte. Dans le cas de plantules, il ne semble pas que le brome soit présent en forte concentration. Ces résultats suggèrent que la concentration et le stockage de l'iode et du brome s'effectuent par deux mécanismes distincts.

Figure V.72 - Distribution élémentaire d'une section transversale de stipe de *L. digitata* (plante adulte).

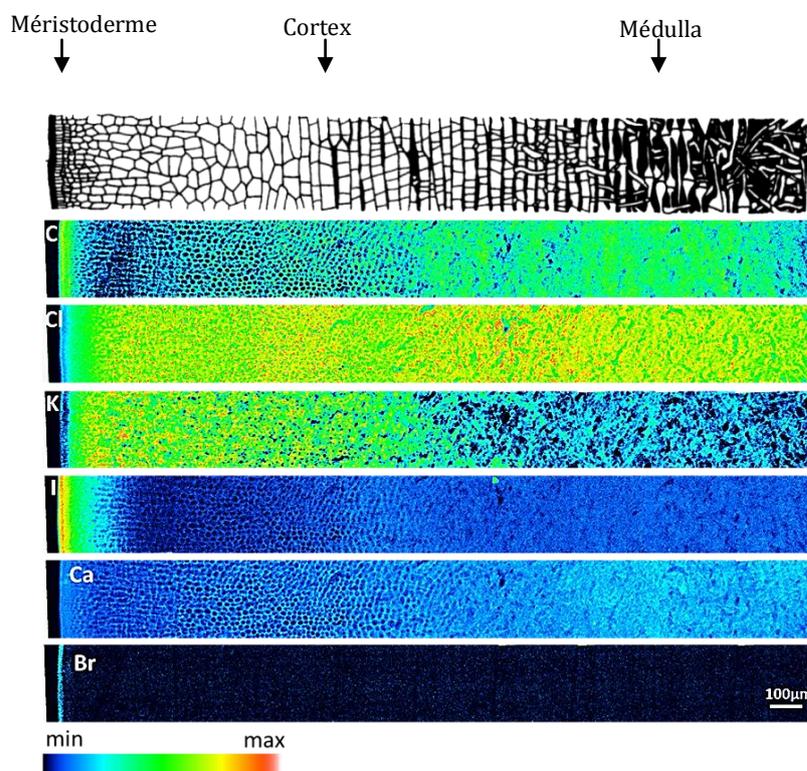
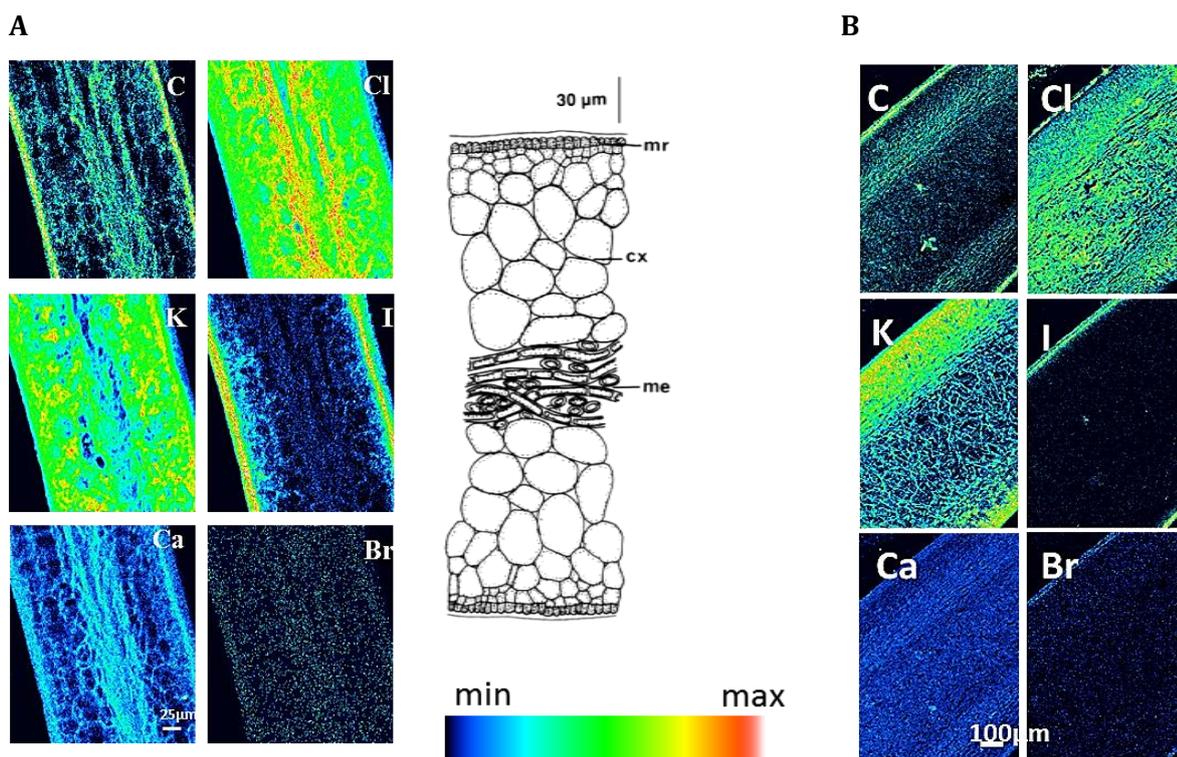


Figure V.73 - Distribution élémentaire d'une section transversale de stipe dans une plantule (A) et une plante adulte chez *L. digitata*. (cx) cortex ; (me) médulla ; (mr) méristoderme.



3 Discussions et perspectives.

La détermination de la distribution de l'iode chez *Z. galactanivorans* et *L. digitata* ainsi que de sa spéciation est une étape importante pour comprendre les mécanismes biologiques associés à la métabolisation de l'iode. En effet la spéciation et la compartimentation de l'iode permet de déterminer sa biodisponibilité et les mécanismes enzymatiques nécessaires à sa métabolisation.

Les premières expériences d'imagerie chimique chez *Z. galactanivorans* par DESI-TOF, nano-SIMS et PIXE n'ont apporté aucun résultat satisfaisant sur la localisation et la spéciation de l'iode. Toutefois, le nano-SIMS semble être une technique adéquate pour étudier la localisation subcellulaire de l'iode chez cette bactérie. Il est donc nécessaire de poursuivre les essais et d'améliorer le protocole de préparation des échantillons. La technique de DESI-TOF est aussi une technique intéressante pour répondre à la question de la spéciation de l'iode chez *Z. galactanivorans*. Les tests préliminaires entrepris sur des cultures liquides séchées à l'air libre montrent que les sels présents dans l'eau de mer pourraient conduire au masquage du signal de l'iode. En effet les concentrations sont théoriquement suffisantes pour observer l'iode dans nos échantillons. Il sera donc intéressant de répéter ce même type de mesure sur des cultures en boîte

de Pétri contenant du ZoBell et de l'agarose. L'eau de mer utilisée dans le milieu de culture peut aussi être diluée avec de l'eau ultrapure pour diminuer la concentration en sel. En parallèle à ces études, il est intéressant d'initier des approches globales de métabolomiques afin d'identifier tous les composés organiques iodés produits chez *Z. galactanivorans*. Ces informations permettront de mieux concevoir le rôle et le fonctionnement du métabolisme de l'iode de cette bactérie.

L'imagerie chimique de l'iode par différentes techniques chez *L. digitata* a apporté des informations complémentaires à celles déjà existantes. L'iode est donc concentré en surface de l'algue sous forme d'iodures et est colocalisé avec le carbone dans l'apoplasme du méristoderme. Le MALDI-TOF est une technique efficace pour étudier la spéciation de l'iode, et ses changements lors de réponses de défense de cette algue. En effet, cette technique ne nécessite pas de préparation complexe d'échantillons, pouvant induire des changements de spéciation ou de délocalisation de l'iode. De plus, le MALDI-TOF est moins sensible que le DESI-TOF aux grandes quantités d'iode présentes chez *L. digitata*, provoquant la condensation de l'iode. Les analyses par PIXE et RBS ont permis d'observer la différence de localisation et de distribution de l'iode et du brome entre les différents organes et à différents stades de développement de l'algue. La localisation de l'iode varie légèrement d'un organe à un autre, mais surtout en fonction de l'âge de cette algue. Enfin, il est aussi intéressant de noter que la localisation et la distribution de l'iode et du brome sont différentes et indiquent que ces deux halogènes sont sans doute concentrés de manière indépendante. La forme de stockage de l'iode, I^- , non-organifiée permet une remobilisation rapide lors d'un stress, mais pose la question de la façon dont le piégeage chimique s'effectue dans la paroi. L'apoplasme du méristoderme est composé majoritairement de polysaccharides très divers (alginates, xylo-fuco-glucanes, xylo-fuco-glucuronanes, homofucanes et cellulose), de phlorotanins et de protéines. Afin de connaître le mécanisme de stockage de l'iode dans ce compartiment, il sera intéressant de tester la captation de l'iodure dans des systèmes *in vitro* reconstitués, mimant l'apoplasme avec différents polysaccharides et phlorotanins, et en présence de VHPO.

Les mécanismes enzymatiques impliqués dans l'accumulation et la métabolisation de l'iode chez les organismes marins et en particulier chez les bactéries sont très mal connus. Dans ce contexte, mon travail de thèse a visé à étudier chez la bactérie marine modèle, *Z. galactanivorans*, des protéines potentiellement impliquées dans le métabolisme de l'iode. Ce projet avait pour objectif de :

- Comprendre les mécanismes moléculaires du contrôle de la spécificité chez les haloperoxydases à vanadium par l'étude de la première iodoperoxydase à vanadium caractérisée chez *Z. galactanivorans* par des approches de biochimie et biologie structurale.
- Caractériser de nouvelles protéines pouvant être impliquées dans un métabolisme de l'iode chez *Z. galactanivorans*.
- Mieux comprendre l'évolution du métabolisme de l'iode chez les organismes vivants.

1 Nouvelles enzymes impliquées dans le métabolisme iodé et rôles potentiels chez *Z. galactanivorans*

Depuis les années 2000, quelques études tendent à montrer que les bactéries sont capables d'oxyder ou de volatiliser l'iode, cependant peu de mécanismes enzymatiques ont été caractérisés [Amachi *et al.*, 2005b; Suzuki *et al.*, 2012]. Lors de l'annotation du génome de *Z. galactanivorans*, 4 gènes ont retenus notre attention. Tout d'abord, 3 d'entre eux pouvaient coder pour des haloperoxydases à vanadium. L'une d'elles a été caractérisée au niveau biochimique et structurale avant ce travail de thèse et s'est révélée être une iodoperoxydase à vanadium. Il restait donc à caractériser 2 autres VHPO potentielles et j'ai pu mener à terme la caractérisation biochimique de l'une d'entre elles, par des approches d'expression hétérologue. Cette enzyme, Zg-VIPO2, s'est révélée être spécifique de l'oxydation de l'iodure comme Zg-VIPO1. Cependant, à la différence de la première enzyme qui serait excrétée, Zg-VIPO2 semble être une enzyme cytoplasmique, possédant des paramètres catalytiques similaires à ceux de Zg-VIPO1. La seconde protéine à laquelle je me suis intéressé est Zg-4305, une protéine similaire aux iodotyrosine déiodinases (IYD). Malgré de nombreux indices montrant que cette protéine est une IYD, aucune activité biochimique n'a pu être caractérisée au cours de ce travail.

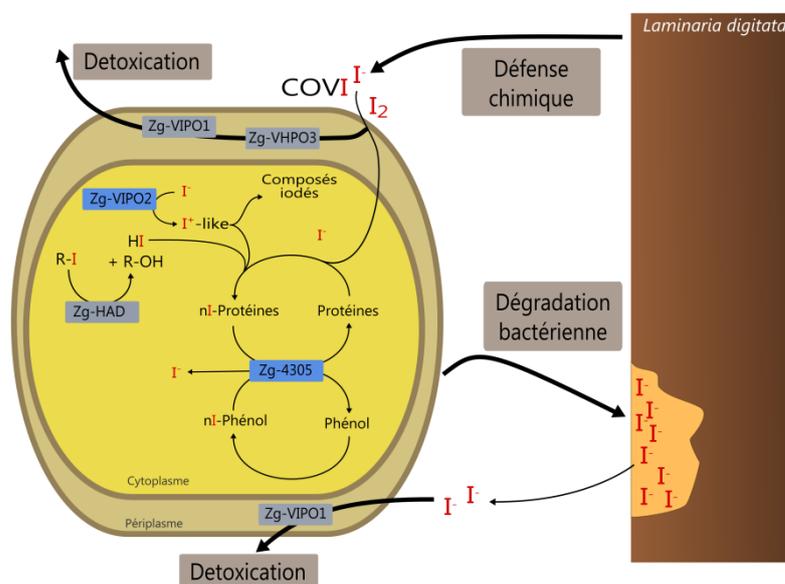
La présence d'enzymes oxydant l'iodure et potentiellement déiodinant des composés organiques iodés chez *Zobellia* conduit à se questionner sur le rôle biologique de telles enzymes et

sur les fonctions du métabolisme de l'iode chez cette bactérie. Malgré des tests infructueux d'imageries pour visualiser des composés iodés, d'autres expériences préliminaires ont montré la présence d'iodotyrosines dans des extraits protéiques de *Z. galactanivorans* par Western blot, ainsi que du iodophenol dans le surnageant de culture de cette bactérie. Ces résultats suggèrent qu'il existe une métabolisation de l'iodure chez cette flavobactérie et qu'elle serait capable de produire des composés iodés.

Z. galactanivorans, comme d'autres bactéries associées aux algues brunes, dont les laminaires, peut se retrouver en contact avec d'importantes quantités d'iode moléculaire (I_2) émises par celles-ci lors des réactions de défense. L' I_2 peut ensuite provoquer l'iodation de protéines cytosoliques et conduire à la mort de la bactérie. En effet, l'iode moléculaire est un antiseptique puissant, car il a la capacité de pénétrer dans les microorganismes et d'interagir avec la matière organique [Pour revue: Moore and Payne, 2004; Cooper, 2007]. Les liaisons de l'iode aux fonctions S-H des cystéines ou des méthionines ainsi qu'aux fonctions N-H de l'arginine, l'histidine et la lysine, ou encore au groupement phénolique de l'histidine conduisent à des perturbations des réseaux de liaisons hydrogènes provoquant la dénaturation de protéines [Pour revue: Punyani et al., 2006; Cooper, 2007]. Dans ce contexte, la fonction de Zg-4305 pourrait être multiple. Tout d'abord, cette protéine pourrait prévenir l'iodation des protéines lors des interactions avec les algues brunes et déioder des composés cytotoxiques phénoliques iodés, tels que des dérivés de la tyrosine (**Figure VI.74**). La protéine Zg-4305 peut sans doute aussi avoir un rôle associé aux VHPO. En effet, la présence d'une iodoperoxydase (Zg-VIPO2) et d'une haloacide déhalogénase (Zg-HAD) putative identifiée sur le génome pourrait être à l'origine de la production d'espèces réactives de l'iode et de la dénaturation de protéines par iodation dans le cytoplasme (**Figure VI.74**). Zg-4305 aurait alors un rôle de détoxification interne de protéines cytosoliques iodées de *Z. galactanivorans*.

Les localisations putatives différentes des VIPO chez *Zobellia* peuvent indiquer que ces protéines possèdent des fonctions biologiques différentes. La VIPO cytoplasmique pourrait participer à la synthèse de composés iodés à l'intérieur de la bactérie, tel que l'iodophenol. Les deux autres VHPO pariétales, Zg-VIPO1 et Zg-VHPO3, pourraient être impliquées dans des mécanismes de défense lors d'expositions importantes à l'iode, notamment lors d'interactions avec les laminaires (**Figure VI.1**). Elles pourraient aussi permettre l'halogénéation de composés organiques synthétisés par d'autres organismes vivants afin d'en inhiber la fonction.

Figure VI.74 – Modèle hypothétique des voies impliquant les enzymes liées au métabolisme de l'iode chez *Z. galactanivorans*



En perspective, il est nécessaire de poursuivre la caractérisation de Zg-VHPO3 et Zg-4305, et d'établir leurs fonctions biochimiques *in vitro*. Une autre perspective à court terme est de résoudre la structure tridimensionnelle de Zg-4305, pour laquelle un jeu de données de bonne qualité a été obtenu au synchrotron de Grenoble. Les analyses biochimiques et structurales de Zg-4305 pourraient à terme conduire à définir une nouvelle famille enzymatique ou bien à la caractérisation d'enzymes bactériennes homologues aux IYD de mammifères. Pour compléter les données sur le métabolisme iodé chez *Z. galactanivorans*, il est aussi important de vérifier par spectrométrie de masse la présence de composés iodés et d'étudier leur spéciation par DESI-TOF. L'analyse de l'expression des différents gènes codant pour les différentes VHPO et Zg-4305 pourra aussi être entreprise par PCR quantitative dans différentes conditions de croissance (en présence ou non de composés iodés ou d'extraits d'algues). Enfin, des approches fonctionnelles pourront être envisagées pour vérifier la fonction biologique des différentes protéines identifiées, comme la production de mutants « knock-out » de *Z. galactanivorans* ou l'expression hétérologue de ces gènes dans d'autres bactéries marines.

2 Evolution du métabolisme iodé chez les organismes vivants

Le métabolisme des halogènes n'est pas ubiquitaire chez les organismes vivants et plus particulièrement celui de l'iode. L'étude de l'évolution des enzymes impliqués dans ce métabolisme

protéines ASPIC/UnbV. Le gène *zg-vhpo3* se situe quant à lui dans un contexte très différent des deux premiers et ne semble pas faire partie d'un opéron. Il est donc fort probable que ce troisième gène n'a pas la même histoire évolutive proche, que les deux iodoperoxydases identifiées chez *Z. galactanivorans*, bien qu'ils dérivent sans doute tous d'un même ancêtre commun. En l'absence de données biochimiques sur les spécificités des différentes VHPO bactériennes, il est difficile de dire qu'elle était la nature de la protéine ancestrale. Néanmoins, la présence d'activités chloroperoxydases chez des actinobactéries suggèrent que la spécificité pour l'iode serait apparue plus récemment chez *Z. galactanivorans*. Celle-ci résulterait d'une convergence évolutive, en lien avec des niches écologiques riches en iode, comme la surface d'algues brunes telles que *L. digitata* (**Figure VI.75**).

Une autre particularité mise en évidence chez *Z. galactanivorans* est la présence d'une protéine, Zg-4305, similaire à des protéines bactériennes inconnues, mais très proche au niveau phylogénétique des iodotyrosines déiodinases caractérisées chez les mammifères. Celles-ci sont impliquées dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes. La majorité des bactéries possédant un gène homologue aux IYD ont été isolées de milieux aquatiques. La présence de ces protéines uniquement chez les chordés et les Bacteroidetes pourrait dériver d'un transfert latéral de gènes entre ces deux *phyla* au cours de l'évolution (**Figure VI.75**). La question de l'origine et de la nature de ce transfert latéral se pose alors. Le séquençage du génome de l'amphioxus marin, *Branchiostoma floridae*, a révélé la présence d'un gène codant aussi potentiellement pour une IYD [Putnam *et al.*, 2008]. Cet amphioxus est un membre des céphalochordés, groupe monophylétique à la base des chordés. Ces résultats semblent indiquer que le transfert latéral entre les deux *phyla* aurait eu lieu précocement au cours de l'évolution des chordés et se serait sans doute déroulé dans le milieu marin. Néanmoins, la présence de protéines similaires aux IYD devra être vérifiée dans les autres *phyla* eucaryotiques ou bactériens, par une analyse plus complète des bases de données génomiques publiées.

Ces résultats combinés aux analyses phylogénétiques menées sur les VHPO devraient permettre d'avoir une vision plus exhaustive de la répartition des enzymes du métabolisme halogéné au sein de l'arbre du vivant, et contribuer à mieux comprendre son évolution.

3 Mécanismes moléculaires contrôlant la spécificité chez les haloperoxydases à vanadium

L'un des principaux objectifs du projet de thèse était d'étudier les mécanismes moléculaires contrôlant la spécificité chez les VHPO par l'analyse biochimique et structurale de la protéine Zg-VIPO1 et de mutants. Pour la construction de mutants, la comparaison de la structure 3D de cette enzyme avec celles déjà publiées a permis de cibler un résidu présent sur une boucle positionnée à l'entrée du site actif, ainsi que trois autres résidus présents autour du site actif contenant le vanadate. Enfin, d'autres résidus ont aussi été ciblés directement dans le site actif de Zg-VIPO1. Au final, douze mutants ont été produits et caractérisés sur le plan biochimique, et pour certains au niveau structural.

L'analyse biochimique a révélé que l'His360 et l'Arg410 sont des résidus nécessaires à l'activité enzymatique chez la iodoperoxydase de *Z. galactanivorans*, comme cela avait été montré pour les VCPO et VBPO déjà étudiées [Macedo-Ribeiro *et al.*, 1999a; Renirie *et al.*, 2000b]. Du fait de sa localisation dans le site actif, l'Arg410 ne semble pas être important dans l'interaction directe avec les substrats. Son rôle, comme celui de l'His360, pourrait être d'orienter le vanadate dans le site actif, face aux autres résidus afin de permettre l'oxydation des halogénures. En parallèle, cette étude a aussi montré que les mutations Tyr263Ala et Ser358Ala induisent une faible activité bromoperoxydase chez les enzymes mutantes. Les causes du changement de spécificité ne sont pas claires. Nous proposons que la mutation de la tyrosine de la boucle pourrait provoquer une augmentation de sa flexibilité conduisant à la perturbation d'un pont salin entre un acide aspartique et l'Arg410. Ces changements pourraient par la suite modifier la force des liaisons hydrogènes entre l'Arg410 et les oxygènes équatoriaux du vanadate, augmentant ainsi le potentiel d'oxydoréduction de ce dernier. La mutation de la Ser358 en alanine pourrait quant à elle conduire aussi à une augmentation du potentiel, mais cette fois-ci à cause de la rupture de la liaison hydrogène existante entre la sérine et un oxygène équatorial du cofacteur.

En parallèle, nous nous sommes intéressés à la coordination du vanadium dans le site actif de Zg-VIPO1 par la technique de XAS. L'analyse préliminaire des résultats a ainsi montré que la coordination fine du vanadate et du peroxovanadate, au sein de Zg-VIPO1, est différente de celles observées chez Ci-VCPO et chez An-VBPO1. Ces différences de structures chez Zg-VIPO1 et Ci-VCPO, et qui ne sont pas observables par une approche de diffraction des rayons X, peuvent être des arguments en faveur de l'hypothèse qu'il existe une différence du potentiel d'oxydoréduction du vanadate chez ces enzymes. Ces changements de potentiel pourraient expliquer les changements de spécificité entre ces enzymes.

Pour confirmer cette hypothèse trois approches seront à développer. Tout d'abord, la structure tridimensionnelle de la seconde iodoperoxydase de *Z. galactanivorans* permettra de caractériser les résidus de la seconde sphère de coordination du vanadate, potentiellement impliqués dans le contrôle de la structure du site actif et de la spécificité pour l'iode chez ces VIPO. Ensuite, l'étude de nouveaux mutants de la seconde sphère permettra de vérifier nos hypothèses sur l'impact de ces résidus sur les changements de spécificité. A terme une analyse *in silico* par QM/MM ou DFT des structures fines du vanadate et peroxovanadate obtenues par XAS permettra de déterminer la protonation des oxygènes et le potentiel d'oxydoréduction du vanadate et du peroxovanadate. Cette analyse pourra être réalisée sur des enzymes ayant des spécificités différentes et la comparaison des données permettra de vérifier notre hypothèse sur le rôle du potentiel d'oxydoréduction du vanadate dans le contrôle la spécificité chez les haloperoxydases à vanadium.

Les études menées durant ce projet de thèse visaient à mieux comprendre le métabolisme de l'iode et à l'évaluer chez la bactérie marine, *Z. galactanivorans*. Les résultats obtenus à partir Zg-VIPO1 apportent un nouvel éclairage sur les mécanismes contrôlant la spécificité chez les haloperoxydases à vanadium envers les halogénures. Plus globalement, ils permettent d'appréhender le rôle du métabolisme de l'iode et sa répartition chez certaines bactéries marines et leurs importances dans le cycle biogéochimique de l'iode.

Manuscript de l'article traitant des deux iodoperoxydase à vanadium isolées de *Z. galactanivorans*

Phylogeny and structure of a novel bacterial vanadium iodoperoxidase suggest convergent evolution for iodide specificity

Ludovic Delage^{a,b} *, Etienne Rebuffet^{a,b} * §, Jean-Baptiste Fournier^{a,b}, Romain Grijol^{a,b}, Sophie Le Pansec^{c,d}, Laurence Meslet-Cladière^{a,b}, Justyna Rzonca^{a,b}, Philippe Potin^{a,b}, Gurvan Michel^{a,b}, Mirjam Czjzek^{a,b}, Catherine Leblanc^{a,b}

Short title: Crystal structure of vanadium-dependent iodoperoxidase

Author affiliation:

a Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR 7139, Station Biologique, Place Georges Teissier, CS 90074, 29688 Roscoff CEDEX, France

b CNRS, UMR 7139 Marine Plants and Biomolecules, Station Biologique, Place Georges Teissier, CS 90074, 29688 Roscoff CEDEX, France

c Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, FR 2424, Station Biologique, Place Georges Teissier, F-29680 Roscoff, France

d CNRS, FR2424, Station Biologique, Place Georges Teissier, F-29680 Roscoff, France

These authors contributed equally to this work

§ Present address: Department of cellular and molecular biology, Biochemistry and biophysics, University of Gothenburg, Box 462, SE-405 30 Göteborg, Sweden.

Corresponding author :

Catherine Leblanc

UMR 7139, Station Biologique, Place Georges Teissier, F-29680 Roscoff, France

Tel.: 33 (2) 98 29 23 62

Email: catherine.leblanc@sb-roscoff.fr

Keywords: vanadium-dependent haloperoxidase; iodine; crystallography

Significance

In the marine environment, biogenic volatile organo-iodines and molecular iodine are the main vectors of the iodine biogeochemical cycling, and vanadium-dependent haloperoxidases (VHPO) should be involved in their biosynthesis. We present here the crystal structure of a vanadium-dependent iodoperoxidase. Both 3D structure comparison and phylogenetic analyses showed that the specialization of VHPO versus iodide oxidation occurred independently, at least twice in algal and bacterial lineages, during VHPO evolution. The characterization of such specific enzymes in a marine flavobacterium and the occurrence of VHPO homologs in numerous bacterial lineages also suggest that marine bacteria not only actively participate to iodine enzymatic bioconversion processes, but also in general cycling of halogen compounds in marine ecosystems.

Introduction

Halogenated compounds are abundantly found in nature, and play various biological functions, ranging from chemical defense to signaling molecules (Manley, 2002). Indeed halogenation (i.e. iodination, bromination or chlorination) seems to be an efficient strategy used to increase the biological activity of secondary metabolites (Butler and Sandy, 2009) and a large majority of biogenic halogenated compounds have been characterized in marine organisms (Gribble, 2003; Paul and Pohnert, 2011; Gribble, 2012). At a global scale the marine sources of volatile halocarbons, especially iodinated ones, have been explored by geochemists because of their influence on the atmospheric chemistry, on the oxidative capacity of the air, as well as in aerosol nucleation and growth. These chemical processes have significant impact on ozone depletion, cloud formation and local climate changes (for reviews, O'Dowd et al., 2002; Von Glasow, 2008; McFiggans et al., 2010; Saiz-Lopez and von Glasow, 2012; Saiz-Lopez et al., 2012; Carpenter et al. 2012). While some brown macroalgae are important contributors to iodine transfer in the coastal marine environment, due to their active iodine metabolism and their ecological importance (Küpper et al. 2008; Ball et al. 2010; Huang et al. 2013), several classes of bacteria should also contribute to the global iodine cycling through volatilization, oxidation, and accumulation of iodine, as suggested by phenotypic characterizations of different bacterial strains (for review, Amachi, 2008). However, the importance of iodine-conversion and related enzymatic processes remain under-explored in marine microorganisms. Moreover, the understanding of iodine bacterial bioconversion is a challenging research field regarding the risks of a radioactive iodine contamination in the environment (for review, Amachi et al. 2008).

Among halogenating enzymes, haloperoxidases (HPO) catalyze, in the presence of hydrogen peroxide, the oxidation of halides according to the following reaction: $H_2O_2 + X^- + H^+ \rightarrow H_2O + HOX$, wherein X^- represents a halide ion and may be Cl^- , Br^- or I^- . A variety of halocarbons can subsequently be generated if the appropriate nucleophilic acceptors are present. The nomenclature of haloperoxidases is based on the most electronegative halide they can oxidize: chloroperoxidases can catalyze the oxidation of three different halides chloride, bromide and iodide, whereas bromoperoxidases can only oxidize bromide and iodide, and iodoperoxidases are specific for iodide (for review, Winter and

Moore, 2009). The subclass of vanadium-dependent HPO (VHPO) is particularly studied as these enzymes are able to halogenate a broad range of organic substrates that present several economic interests (for reviews, Wischang et al. 2011; Smith et al. 2013). Furthermore, they are highly stable towards drastic conditions (high temperatures, oxidation and organic solvents) that make them good candidates for applications in industrial biotransformations (Vilter, 1995; Butler et al., 2001).

Since the first discovery of a VHPO in the brown alga *Ascophyllum nodosum* thirty years ago (Vilter, 1983; Wever et al., 1985), structural and mechanistic studies were focused on two types of eukaryotic VHPO, namely the vanadium-dependent chloroperoxidase (VCPO) from the pathogenic fungus *Curvularia inaequalis* (Messerschmidt and Wever, 1996), and the vanadium-dependent bromoperoxidases (VBPO) from *A. nodosum* (Weyand et al., 1999), and from the red algae *Corallina pilulifera* (Shimonishi et al., 1998; Ohshiro et al., 2002) and *Corallina officinalis* (Isupov et al., 2000; Carter et al., 2002). Molecular and biochemical data have also been reported for several algal VBPO (e.g. Colin et al; 2003; Wischang et al. 2012; Sandy et al. 2011; Baharum et al. 2013). The so far characterized fungal VCPO and algal VBPO are mainly folded in alpha helices which combine into helix bundles. Quaternary structures differ between the different phyla; the *C. inaequalis* VCPO is monomeric in solution (Messerschmidt and Wever, 1996), whereas the VBPO from brown algae forms covalently bound dimers (Weyand et al., 1999; Wischang et al. 2012) and the dimers of the red algal VBPO self-rearrange into a dodecamer (Isupov et al., 2000). Up to now, only one vanadium-dependent iodoperoxidase (VIPO) protein was characterized from the brown alga *Laminaria digitata* (Colin et al. 2003, 2005). While the algal VHPO proteins present similarities at the primary sequence level, suggesting a common origin of both VBPO and VIPO (Colin et al., 2005), no structural data are yet available for these iodide-specific enzymes.

Exponentially-increasing databases of bacterial genomes and metagenomes allow the identification of VHPO-like genes in numerous bacterial lineages. However, the *in vivo* biochemical function of corresponding enzymes was only demonstrated for VCPO of two marine *Streptomyces* sp. strains, which are involved in the chlorination cyclization steps of antibiotic biosynthesis, such as napyradiomycin and merochlorin (Winter et al. 2007; Bernhardt et al.,

2011; Kaysser et al. 2012). A functional VBPO was also reported in two strains of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp., and gene homologs detected in cyanobacterial environmental DNA samples (Johnson et al., 2011). A genome sequencing project on the marine flavobacterium *Zobellia galactanivorans* provided us with new VHPO homologous sequences (Barbeyron et al., in preparation). This study reports on the enzymatic and structural analysis of the first iodide specific VIPO, characterized from *Z. galactanivorans*. Structural data combined with phylogenetic analyses allow shedding new light on the evolutionary history of the vanadium dependent HPO and on the emergence of iodine specificity among both bacterial and algal phyla.

Results

Recombinant vanadium-dependent iodoperoxidases from *Zobellia galactanivorans*

Three VHPO genes were identified in the genome of *Z. galactanivorans* by expert annotation based on sequence similarities with available VHPO proteins (Barbeyron et al., in preparation). The gene loci *zobellia_1262*, *zobellia_2088* and *zobellia_2250* are 1353-, 1326- and 1455-bp nucleotide sequences, coding for proteins of 450, 441 and 484 amino-acid lengths, respectively. Signal peptides (SP) were predicted using SIGNALP v.4.1 (Petersen et al. 2011). The protein products of *zobellia_1262* and *zobellia_2250* are expected to carry respectively a type II and a type I SP whereas *zobellia_2088* protein is rather cytoplasmic. At the protein level, the translated open-reading frame of *zobellia_1262* shares 46 % and 20 % amino-acid identities with the coding-regions of *zobellia_2088* and *zobellia_2250*, respectively. The three proteins feature conserved amino acid residues found to be involved in the catalytic activity and in the coordination of the vanadate cofactor in VCPO of *C. inaequalis* and algal VBPO (SI Appendix, Fig. S1).

The nucleotide sequences of *zobellia_1262* and *zobellia_2088* protein-coding regions, excluding the sequence of the putative signal peptides, were cloned into expression vectors, carrying a hexahistidine Tag. The resulting recombinant proteins contain respectively 445 and 428 amino acids, including six histidines at the N-terminal position. Following successful overexpression in *Escherichia coli*, recombinant proteins with the expected size of ~ 50 kDa were purified from the soluble fraction as monomeric proteins, and named Zg-VIPO1 (*zobellia_1262*) and Zg-VIPO2

(*zobellia_2088*) (SI Appendix, Fig. S2A). By western blotting, both purified proteins were recognized by polyclonal antibodies raised against Zg-VIPO1 (SI Appendix, Fig. S2B).

Bromo- and iodoperoxidase activities of Zg-VIPO1 and Zg-VIPO2 were monitored using the Thymol Blue (TB) colorimetric assay developed by Verhaeghe et al. (2008). In presence of iodide or bromide and in absence of enzyme and/or hydrogen peroxide, the yellow color of TB was stable at pH 7.8 (Fig. 1), and was related to the monoanionic compound containing a quinoid group (Verhaeghe et al. 2008). The blue coloration clearly appeared after a few minutes when enzymes and H₂O₂ were added to the reaction mixture, corresponding to the formation of TBI₂ or TBBr₂, as observed using the purified native VBPO1 of *A. nodosum*. Interestingly the change of color was only detected in the presence of iodide for both Zg-VIPO1 and Zg-VIPO2, which showed no activity in the presence of bromide (Fig. 1). TB assays were further investigated by spectrophotometry in presence of KBr but no bromoperoxidase activity was monitored for both recombinant enzymes. Similarly, neither chloroperoxidase nor bromoperoxidase activities were detected using O-dianisidine in native gel activity assay (SI Appendix, Fig. S2C). Using the TB iodoperoxidase assay, Zg-VIPO1 and Zg-VIPO2 specific activities showed typical Michaelis-Menten kinetics as a function of iodide concentration in the initial part of the curve. The Lineweaver-Burk analysis at fixed levels of iodide from 0.125 to 0.5 mM was therefore used to calculate the kinetics parameters of Zg-VIPO1 and Zg-VIPO2 (Table 1). The thermostability of the recombinant enzymes was also investigated: upon heating for 10 min, the purified Zg-VIPO1 remained fully active up to 40 °C. Dynamic light scattering (DLS) analyses were carried out to monitor the hydrodynamic radius curve upon temperature increase (SI Appendix, Fig. S2D) and establish the melting temperature of the two recombinant enzymes (Table 1).

Crystal structure determination of Zg-VIPO1

The Se-Methionine labeled Zg-VIPO1 was crystallized in space group P212121 and unit cell parameters of $a = 42.84 \text{ \AA}$, $b = 84.36 \text{ \AA}$ and $c = 117.38 \text{ \AA}$. The asymmetric unit corresponds to a monomer, giving a solvent content of 43 % and a crystal volume per protein mass of $2.17 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ (Matthews, 1968). The crystal structure of Zg-VIPO1 has been solved by Multi-wavelength Anomalous Diffraction (MAD) at 1.8 \AA using a single crystal of seleno-methionine labeled protein (SI Appendix, Table S2). The refinement statistics are presented in SI Appendix, Table S3. The final model contains 400 residues out of the 445 of the recombinant Zg-VIPO1, the vanadate

cofactor, one sodium cation and 307 water molecules. More than 99 % of the residues are in the most favored regions of Ramachandran plot and no outlier. The cysteine 260 appears to be an oxy-cysteine with 2 alternative conformations. Loops formed by residues Phe173 to Asp178 and Val266 to Thr275 are not visible in the 2Fo-Fc electron density map and are presumed to be highly flexible.

Overall structure of the first vanadium-dependant iodoperoxidase, Zg-VIPO1

Zg-VIPO1 has a cylindrical shape with an approximate length of 85 Å and a diameter of 50 Å. It is mainly folded in alpha helices (SI Appendix, Fig. S3A) as already observed in other known structures of VHPO. Indeed its global monomeric structure is folded into fourteen α -helices and two β -helices (helices 7 and 14), which represent 49.7 % of the model (Fig. 2A). In Zg-VIPO1, two β -strands constituted by residues Phe 381 to Asp 383 and Arg 394 to Phe 396 form an antiparallel β -sheet at the surface of the protein. The core of the overall structure is composed of two bundles of five α -helices (Fig. 2A), helices 1 to 5 for the bundle 1 and helices 10, 11, 13, 15 and 16 for the second one (Zg-VIPO1 numbering). The sodium binding site is located at the end of helix 2 and interacts with the protein by binding three carbonyl of the main chain (residues Ala54, Asn57 and Tyr60). Its position induces a change in the direction of the main chain which probably stops the helix 2 at this position, suggesting a structural role of this sodium ion. The two bundles are relied by an axis of symmetry perpendicular to the helices and located between the two bundles (Fig. 2A). The helix bundle 1 doesn't have insertion in loops between helices, unlike the helix inserted between helices 2 and 3 in the VCPO of *C. inaequalis* (Fig. 2B). The helix bundle 2 contains two insertions in loops. The first one is the helix 12 which is also observed and superimposable in other structures of VHPO. The second insertion is found between helices 13 and 15 and is formed by two beta-strain separated by a β -helix. Insertions in this loop are also observed in other structures of VHPO, but with different motifs (Fig. 2 A-C). The global structure of Zg-VIPO1 is relatively similar to that of *C. inaequalis* VCPO, but the standard deviation between the two structures (1.79 Å) is significantly visible (Table 2). However, in agreement with secondary structure topology comparisons (Fig. 2 A-C), standard deviations are more pronounced compared to algal VBPO of *C. officinalis*, *C. pilulifera* and *A. nodosum* (Table 2). The Zg-VIPO2 protein shares sufficient overall amino acid sequence identity (46 %) with the Zg-VIPO1 protein to generate a 3D model structure,

showing that thirteen of the 14 alpha-helices present in Zg-VIPO1 are well-positioned (SI Appendix, Fig. S3B).

Vanadium binding active site

Because of the presence of phosphate (PO4) during the crystallization process, the nature of the co-factor bond in the active site pocket was further investigated. The electron density map was obtained after refinement of Zg-VIPO1 either with vanadate, either with inorganic phosphate in the active site (SI Appendix, Fig. S3C-D). The difference density 2Fo-Fc maps revealed a higher lack of electron for PO4-refined structure, confirming the presence of the vanadate cofactor into the active site of Zg-VIPO1 protein structure, and not inorganic phosphate.

The vanadate binding site is situated at the N-terminal of helix 13 at the SGH motif (residues 358-360, SI Appendix, Fig. S1). The vanadate cofactor is covalently bound to the NE2 of His 416 (Fig. 2D), a residue strictly conserved in all VHPO sequences (Fig. 2E-F; SI Appendix, Fig. S1). Residues of the first coordination sphere of vanadate are Trp321 and Lys324 in the C-terminal part of helix 11, Arg331, Ser358, Gly359 and His360 in the N-terminal part of helix 13, Phe353 and Arg410 in helix 15 and His416. In Zg-VIPO2, these amino acids of the active site are conserved compared to Zg-VIPO1 (SI Appendix, Fig. S1). Interestingly, all these nine residues are also strictly conserved with the fungal *C. inaequalis* VCPO (Fig. 2E; SI Appendix; Fig. S1) and both active sites are very similar with a standard deviation between these residues of 0.258 Å. The algal VBPO active sites feature more structural differences compared to the Zg-VIPO1 one. All red and brown algal VBPO have a histine residue in place of Phe353 in Zg-VIPO1 (Fig. 2F). Moreover the two red algal VBPO from *C. pilulifera* and *C. officinalis* present an arginine in place on the Trp321 of Zg-VIPO1 (Littlechild and Garcia-Rodriguez, 2003).

Phylogenetic analyses of vanadium dependent haloperoxidases

A phylogenetic analysis was carried out using protein maximum likelihood (PML) tree reconstruction based on alignment of 122 amino acid sequences of all available eukaryotic VHPO found in protein database and of bacterial homologs from representative complete genomes (Fig. 3; SI Appendix, Fig. S4, Table S4, for full tree and sequence information). Five sequences of bacterial nonspecific acid phosphatases, which also belong to the type 2 phosphatidic acid phosphatase (PAP2) superfamily, were used as outgroup, as they are likely to share a common evolutionary history with VHPO (Winter and Moore, 2009). In the PML tree (Fig. 3), two

heterogeneous and separated groups appear, with both a mix of bacterial and eukaryotic sequences. The first smallest one is well supported by a high bootstrap value of 99 % and groups together all the VHPOs from Stramenopiles and Rhodophyta algae, which have been characterized at the biochemical and/or structural level, and diverse bacterial proteins (e.g., Cyanobacteria, Firmicutes and Actinobacteria), for which no enzyme activity has been reported. Inside this cluster, all the brown algal VHPO are closely related, and later spread into two branches, one including the VBPO1 of *A. nodosum* and the VIPO from *L. digitata* and the other bearing the second isoform of *A. nodosum* (VBPO2) and the VBPO of *L. digitata*. The red algal VBPOs form a strong monophyletic group with few cyanobacterial VBPO proteins, one of which has recently been characterized in a *Synechococcus* strain (Johnson et al. 2011). On the other part of the tree (Fig. 3), much more bacterial sequences are present, with most of the bacterial phyla represented (mainly Firmicutes, Cyanobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria). The two bacterial iodoperoxidases, Zg-VIPO1 and Zg-VIPO2 are closest to other VHPO homologs from marine Bacteroidetes, and are closely related to other proteins from freshwater and plant-associated Bacteroidetes and Firmicutes species. The third putative VHPO identified on *Z. galactanivorans* genome merges in a separate group, dominated by diverse bacterial origins. The fungal VCPO, including that of *C. inaequalis*, form a monophyletic group, and merge as sister group of proteobacterial proteins from plant and terrestrial habitat species. Few other putative VHPO identified in Eukaryotes, such as Fungi or green algae (Viridiplantae), are shown to merge as independent branches, among diverse bacterial clusters, but with uncertain phylogenetic position. Interestingly, the first bacterial VCPO proteins characterized in *Streptomyces* species form another strong monophyletic cluster, appearing at the base of a well-supported group of algal putative VHPO-like proteins. These multigenic family proteins have been identified on whole sequenced genomes of the red alga *Chondrus crispus* (Collen et al., 2013), the brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Cock et al. 2010) and the diatom *Thalassiosira oceanica* (Lommer et al. 2012).

In vivo expression and sub-cellular localization of VIPO in *Z. galactanivorans*

The in vivo expression of Zg-VIPO1 was investigated by a fractionation of different cellular compartments followed by a western blot analysis (Fig. 4A). A 50kDa band is clearly detected at the corresponding size of the

recombinant Zg-VIPO1 control. The result showed that both internal (cytoplasm, periplasm and membranes) and external (secretome) compartments contain detectable amounts of Zg-VIPO1. As the polyclonal anti-Zg-VIPO1 also recognizes Zg-VIPO2 (SI Appendix, Fig. S2B), it cannot be excluded that Zg-VIPO1 and Zg-VIPO2 are revealed in the same band. Zg-VIPO1 is rather found periplasmic or secreted in a type II secretory pathway by addressing prediction tools (SignalP v4.1, LipoP v1.0, Cello v2.5 and PSORT), whereas Zg-VIPO2 is likely supposed to be cytoplasmic. This multi-subcellular targeting occurrence was confirmed by a TEM approach (Fig.4B). The observations suggest that Zg-VIPO are detected mainly in the cytoplasm compared to periphery, when cultivated in standard conditions of ZoBell medium, corresponding to seawater enriched in nutrients.

To monitor the effect of iodide concentration in the medium on Zg-VIPO1 expression, TEM experiments were conducted with two conditions corresponding to a standard culture in ZoBell medium (containing approximately 0.2 μ M iodide) and a 50 fold times enhanced concentration of iodide, i. e. 10 μ M. The data show that there are only few gold particles and it probably traduces a small quantity of VIPO proteins by considering the entire cell (Fig. 4B and 4C). In addition, the average of immunolabelled VIPO by cell is similar between the 2 conditions of iodide (about 2.6 and 2.8), suggesting no effect of I- increase on protein expression level (Fig. 4D). However, the analysis of the repartition of VIPO in the cellular compartments shows a significant increase in peripheral spaces (periplasm and membranes), from 28.9% in standard to 46.6% in 10 μ M KI condition (Fig. 4E). This result indicates a change in repartition of VIPO with a mobilization from the cytoplasm to the periphery, suggesting a relocalization of the enzymes in case of higher KI concentration. Due to the technical processes, it was not possible to evaluate the quantities of VIPO in secretome in the TEM experiment. Therefore a modification in the content of secreted enzymes might be also observable.

Discussion

The iodide specificity of Zg-VIPO enzymes We showed that two VHPO-homologs recombinant proteins from *Z. galactanivorans* are capable of specifically oxidizing iodide, with similar affinity and catalytic constants (see Table 1), and solved the first 3D crystallographic structure of the vanadium-iodoperoxidase, Zg-VIPO1. The structure of Zg-VIPO1 active site is very well conserved compared to already known

structures of VHPO (Fig. 2) and shares with the chloroperoxidase, Ci-VCPO, strictly the same residues around the vanadate. Given their different specificity, this result supports the fact that the nine residues surrounding the vanadate are thus important for the fixation of the cofactor and the first reaction step (vanadate oxidation), but not for iodide selectivity of Zg-VIPO.

When compared with the VIPO protein characterized in the brown alga *Laminaria digitata* (Colin et al 2003; 2005), Zg-VIPO1 was very different in term of amino-acid residues around the vanadate, as illustrated by their distant position in the PML tree (Fig. 3). The VIPO of *L. digitata* is closely related to brown algal VBPO, such as An-VBPO1, which presented a similar iodide affinity than Zg-VIPO using the Thymol blue assay (Verhaeghe et al. 2008a). However Zg-VIPO displayed reduced catalytic turnovers, by a factor of 40, when compared to An-VBPO1 (kcat of 75 s⁻¹). In comparison to algae VHPO, the two Zg-VIPO1 and Zg-VIPO2 exhibit a relatively low melting temperature with 42 and 36°C, respectively (Table 1). Indeed, the VCPO of *C. inaequalis* has a melting temperature around 70 °C (Van Schijndel, 1994), the VBPO from *C. officinalis* was shown to be stable at 80 °C (Coupe 2007) and the VBPO of *A. nodosum* melt at 90 °C (Wever 1985). This difference in enzyme thermostability might indicate that the different phyla need the enzymes to work in different conditions. The highest stability observed in algal multi-mere VHPO can be explain by the fact that multimerisation increases the protein stability (Marianayagam, 2004). When proteins are exposed to H₂O₂, structural and functional alterations are observed through oxidation (Cabiscol 2000). As VHPO have hydrogen peroxide for substrate, the observed stability might indicate the concentration of H₂O₂ present where the active enzyme is located in vivo, i.e. the cell wall for algal ones and the inter-membrane space for the *Z. galactanivorans* ones.

VIPO are present in a marine flavobacterium and VHPO homologs wide-spread in bacteria phyla.

It is the first time that such vanadium-dependent iodoperoxidase is characterized at the biochemical and structural level. At least two genes are encoding VIPO enzymes in *Z. galactanivorans*, with relatively low amino acid sequence homology between Zg-VIPO1 and Zg-VIPO2 (~48 % amino-acid identity). In the phylogenetic tree (Fig. 3), the two VIPO from *Z. galactanivorans* are separated by several VHPO homologs from marine Bacteroidetes, which could also feature iodoperoxidase activities. The specificity of halogenation of the third homologous protein, Zg-VHPO3, is still unknown

and because of a very low sequence identity (around the C-term of the protein), and an uncertain position in the phylogenetic tree, it is difficult to predict its halide specificity. However the presence of these VHPO, especially those specific for iodide oxidation, suggests that *Z. galactanivorans* has an active iodine metabolism, and questions its biological role in marine flavobacteria. *Z. galactanivorans* is developed as a model of algal polysaccharide degradation, because of the presence of a large panel of specialized polysaccharides degradation enzymes, such as glycoside hydrolase or alginate lyases (Heheman 2010, Rebuffet 2011; Thomas et al. 2012). In brown algal kelps, the enzymatic degradation of cell wall leads to the liberation of oligo-alginates, which are perceived as defense elicitors by the algae (Küpper et al., 2001, 2002). This recognition induces a rapid liberation of Reactive Oxygen Species (ROS) produced by algae during oxidative burst, and a remobilization of the iodide pool located in the surface, tiny associated with cell wall polysaccharides (Verhaeghe et al. 2008; Küpper et al. 2008). Bacterial alginate degraders should cope not only with ROS but also with high amount of I⁻. Immuno-gold localization of Zg-VIPO1 and 2 showed a relocalization of Zg-VIPO at the surface of the bacteria in iodine-enriched culture (Fig. 4), suggesting that *Z. galactanivorans* should use VIPO to specifically convert I⁻ and H₂O₂ into I₂, H₂O and O₂. Iodide-oxidation and I₂ production processes have already been observed in an alphaproteobacterium strain isolated from iodide-rich natural gas brine water, but using a multicopper oxidase (Amachi et al. 2005; Suzuki et al. 2102).

Our phylogenetic analyses also showed that VHPO with unknown halide specificities are likely to be present in numerous bacterial lineages, not only in marine species, but also in bacterial species from freshwater and terrestrial habitats. Up to now very few is reported about their biochemical and biological functions, but halogenation is known to increase the activity of organic compounds (Butler and Sandy, 2009). The bacterial VHPO should play a role during bacterial/bacterial "fight" for carbon source and/or the control of biofilm formation. Indeed, some of VBPO products, such as bromofuranone in the red alga *Delisea pulchra*, are involved in the inhibition of the bacterial quorum sensing (Sandy et al. 2011). In a centric diatom, the production of bromoform was shown to be directly linked to its interactions with bacteria in laboratory experiments, suggesting that both diatoms and bacteria play important roles in controlling volatile bromocarbons emission (Hughes et al. 2013).

In *Micromonospora actinomycetes* species, isolated from marine invertebrates, VCPO were

proposed to participate to the thiocoraline biosynthesis pathway (Lombo et al. 2006). More recently the functional characterization of several marine Streptomyces VCPO have demonstrated the involvement of a chlorination/cyclization step during the production of antibiotics compounds in actinobacteria species (Winter et al. 2007; Bernhardt et al., 2011; Kaysser et al. 2012). In a biological context of defense and/or pathogenic power of marine bacteria, other important roles of VHPO could therefore be related to the biosynthesis of bioactive secondary metabolites. To further explore such biochemical function in marine Bacteroidetes, it will be necessary to develop functional approaches in model species, such as genetic mutagenesis or complementation.

The complex evolution of VHPO is likely to be driven by lateral gene transfer events and later specialization of the enzyme specificity

The restricted capacity to oxidize only iodine appeared at least twice as VIPO are present in distinct Bacteroidetes and Stramenopile lineages (Fig. 3). In kelps, the emergence of VIPO might conduct to the specific iodide accumulation and from ancestral brown algal VBPO gene-duplication, as suggested previously (Colin et al. 2005, Wischang et al. 2012). The iodoperoxidase presence in flavobacteria should result of convergent evolution in iodine-rich niches, such as brown algal surfaces (Verhaeghe et al. 2008). Topology diagrams of VHPO presented in Fig. 3 show that only 8 helices are equivalent between the different VHPO structures, the 5 helices of the helix bundle 2 and the helices 8, 9 and 12 (helices shown in blue). Indeed algae VHPO of the right side of the phylogenetic tree (Fig. 3) don't have the helix bundle 1, which is replaced by the helix bundle of a second monomer. As observed by Isupov et al. (2000), the two domains of Zg-VIPO1 and Ci-VCPO monomers can be superimposed with dimeric algal VBPO. It was then proposed that monomeric VCPO was a result of duplication and fusion of the ancestral gene followed by the loss of one active site (Littlechild et al., 2002), but no sequence similarity remain between the two helices bundles. Our structural and phylogenetic data showed that the « monomeric-type » of VHPO, i.e. closer than Zg-VIPO1 or Ci-VCPO, seems to be much more widely spread in bacteria phyla, suggesting an ancestral prokaryotic origin for these enzymes. The following acquisition of VHPO by some eukaryotes should be the consequence of independent lateral gene transfers from bacterial counterparts, as illustrated by the external position of fungal VCPO proteins in the phylogenetic tree (Fig. 3). It is worth noting that most of the bacterial species from the phylogenetic analysis have been described, in

ecological niches closely associated with eukaryote species (plant-pathogen, alga-endophyte, soil). In photosynthetic macroalgae, another evolutionary scenario involved the spreading of such enzymes through the first plastidial endosymbiosis, between an ancestral cyanobacteria and a unicellular red algal, and later into the Stramenopiles lineages via secondary endosymbiosis (Reyes-prieto et al 2007). If the ancestral VHPO possessed two domains, when ancestral algae acquired a VHPO gene, the loss of the helix-bundle 1, through incomplete gene transfer for instance, should have exposed at the surface a hydrophobic patch which probably conducted to the dimerization. Dimerization was facilitated by the fact that a helix-bundle was replaced by another one in the dimer. In red algae dimers associated to form dodecamers (Isupov et al., 2000) and in brown algae VHPO the dimer interaction was reinforced by covalent disulfide bond between the two monomers (Weyland et al. 1999). A subsequent and more recent secondary transfer from algal host to algal-associated bacteria would explain the under-representation of "dimeric-type" VHPO in the bacterial species. Indeed, the genomic environment of VBPO from *Synechococcus* sp. CC9311 strain, partial metagenomic data and an algal epiphytic life mode supported the hypothesis of a recent acquisition in some marine and estuarine cyanobacteria through red algal gene transfer (Johnson et al 2011). This is also in agreement with the multi-homodimeric form of the cyanobacterial enzyme, as observed in red algal VBPO. Interestingly, similarly to what we observed comparing An-VBPO and Ci-VCPO/Zg-VIPO global topologies, the non-specific acid phosphatase enzyme of *Escherichia blattae*, used as outgroup in the phylogenetic analyses, was shown to be a 150 kDa homohexamer, and its core topology revealed considerable similarity to the active site containing part of Ci-VCPO (Ishikawa et al. 2000), which corresponds to the bundle 2 helices (colored in blue in Fig. 3). However, other putative VHPO identified on the genomes of *C. crispus* and *E. siliculosus* showed high similarities with VCPO from *Streptomyces* sp. Based on sequence homology of NapH1 protein (see SI Fig. S5), the Actinobacteria VCPO seems to be closer from a "monomeric-type" VCPO, suggesting that both types co-exist in marine macroalgae. At this stage, more biochemical characterization of both bacterial and eukaryotic VHPO are necessary to infer global VHPO structural evolution, especially in the newly annotated algal VHPO.

Conclusion:

Novel enzyme and structure for understanding the molecular bases of iodide specificity

The main mutations between ZgVIPO1 and Ci-VCPO are likely to modify the charge around the vanadate. According to the mutagenesis studies conducted on Ci-VCPO (all REFS), none could be related to the iodine specificity of the enzyme.

Mutagenesis in ZgVIPO1

ecological role of bacterial compartments in halogen and iodine cycling.

The characterization of such specific enzymes in a marine flavobacteria and the occurrence of VHPO homologs in numerous bacterial lineages also suggest that marine bacteria actively not only participate to iodine enzymatic bioconversion processes, but also in general cycling of halogen compounds in marine ecosystems.

Acknowledgments

E. Rebuffet was jointly funded by Region Bretagne and CNRS (allocation number 211-B2-9/ARED).

International Research Experiences for Students Project (IRES) Jennifer J. Stewart

FR2424 + Fanny Gaillard

ARED + ToxNuc3 JB Fournier, IDEALG

Materials and methods

A detailed description of materials and methods is provided in the SI Appendix, Materials and Methods. It describes the procedures employed in cloning, overexpression and purification of Zg-VIPO1 and Zg-VIPO2, in enzymatic assays used for detection of haloperoxidase activities, and in Dynamic light scattering analyses. It also details the crystallographic and structure determination steps, and the phylogenetic analysis. Finally it explains the experimental methods used for immunolocalization of Zg-VIPO enzymes in vivo.

Figure legends

Figure 1. Thymol blue assays of purified recombinant VIPO1 (Zg-VIPO1) and VIPO2 (Zg-VIPO2) from *Zobellia galactanivorans* and of purified native VBPO1 from *Ascophyllum nodosum* (An-VBPO1). The enzymatic reactions were performed at room temperature for one hour in clear flat-bottomed microplate wells, containing 250 μ l 0.1 M phosphate buffer pH 7.8, 100 μ M Thymol Blue, 2.5 μ g of purified protein, and 1.5 mM KI and 0.42 mM H₂O₂ for iodoperoxidase assay (KI) or 10 mM KBr and 0.1 mM H₂O₂ for bromoperoxidase assay (KBr). Control assays consisted of no enzyme and/or no H₂O₂ additions in the reaction mixture.

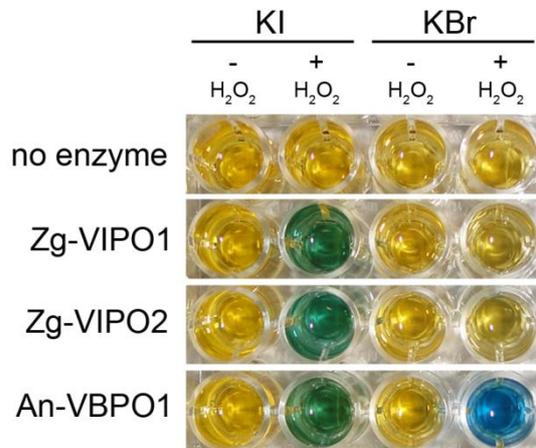


Figure 2. Comparison of secondary structure topologies and vanadate-binding site structures of VHPO monomers. (A, D) VIPO1 from *Z. galactanivorans* (Zg-VIPO1); (B, E) VCPO from *Curvularia inaequalis* (Ci-VCPO, PDB accession no. 1IDQ); (C, F) VBPO1 from *A. nodosum* (An-VBPO1, PDB accession no. 1QI9). The conserved helices between the three VHPO are represented in blue, the first bundle helices (numbered 1-5) are colored in green for Zg-VIPO1 and Ci-VCPO. The monomers are drawn in both 2D and 3D representations, and residues in atom colors are numbered according to the protein sequence. Vanadate (D, E and F) is represented in the center of the picture.

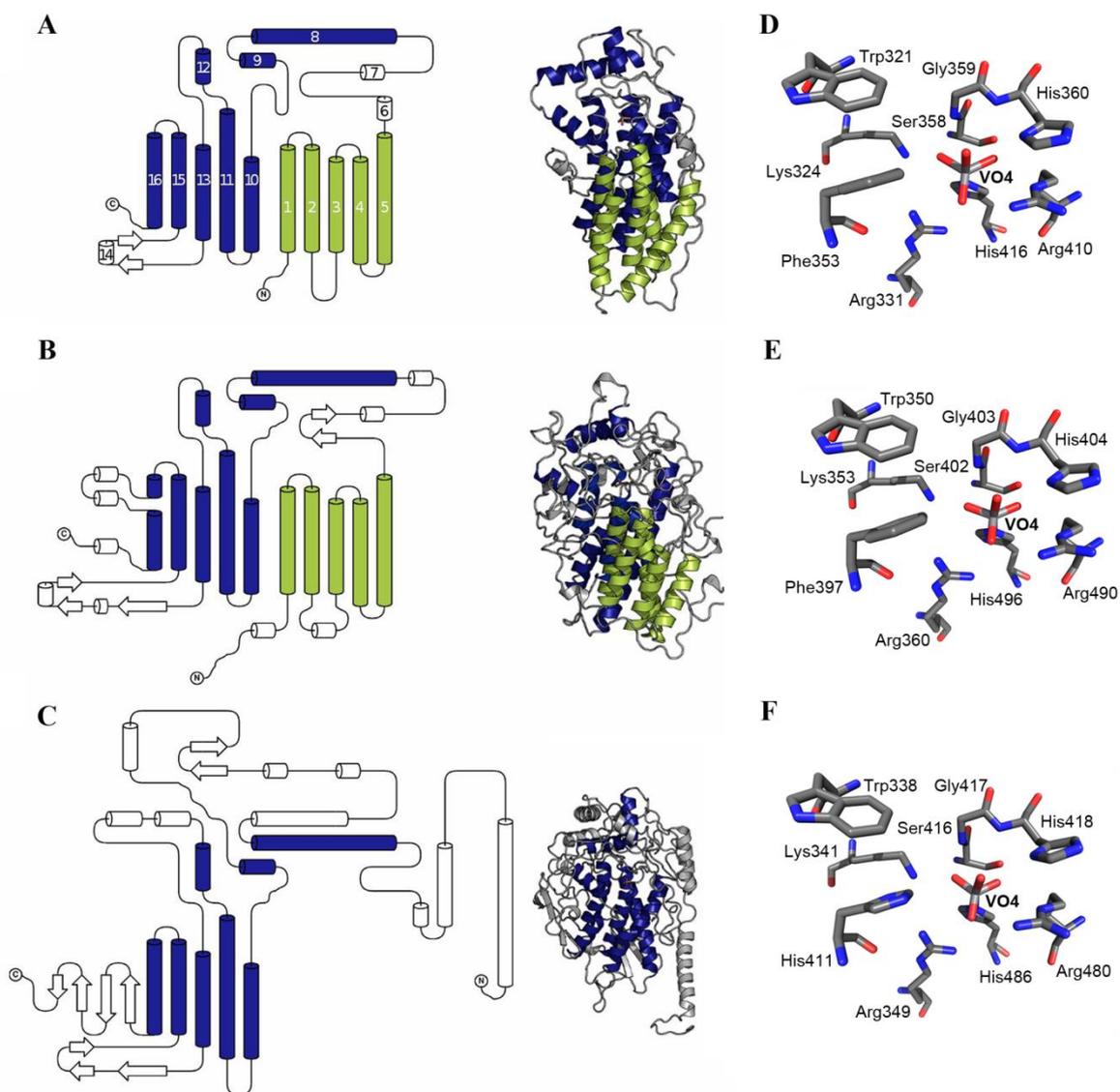


Figure 3. Phylogenetic analysis of VHPO proteins. Protein maximum likelihood (PML) tree was constructed using a multiple alignment of VHPO from 122 selected eukaryotic and bacterial VHPO and of 5 Bacterial Acid Phosphatases as outgroup. 200 informative residues were used for PML analyses and bootstrap values (500 replicates) are provided when strictly above 65%. The full tree with species names and the corresponding NCBI protein accession numbers are provided in SI Appendix (Fig. S5, Table S6). The scale bar represents a difference of 0.1 substitutions per site. When characterized at the biochemical level, the VHPO specificity towards halides is mentioned and refers to the legend code, i.e. iodo- (VIPO), bromo- (VBPO) or chloroperoxidase (VCPO) activity. The available 3D structures of VHPO are indicated by a star.

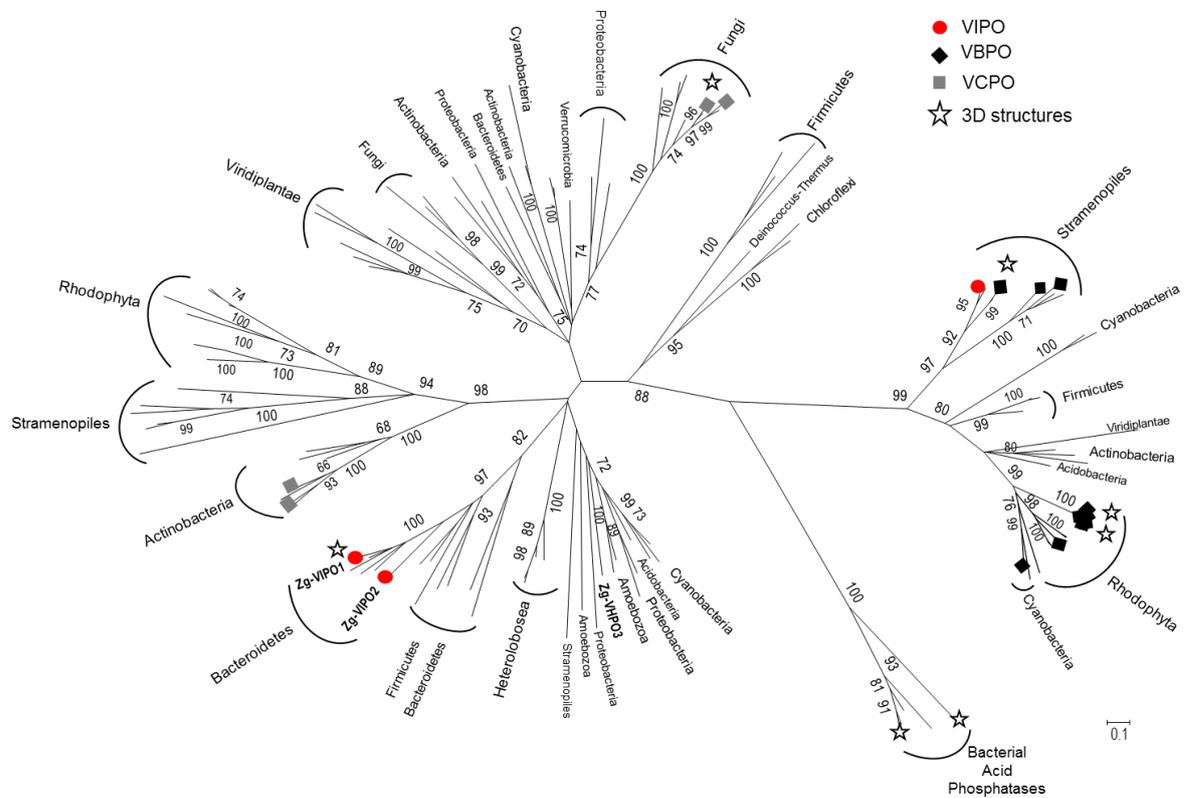


Figure 4. In vivo expression of Zg-*VIPO*. (A) Western blot analysis of the subcellular fractionated proteins using a polyclonal Zg-*VIPO*1 antibody. The corresponding fractions are Se: secreted proteins, C+: Zg-*VIPO*1 purified recombinant protein as control, Ma: protein size marker, Cy: cytoplasm, Pe: periplasmic space, W1: first washing step (before osmotic shock), Me: membranes, W2: second washing step (after osmotic shock), last washing step (before membrane solubilization). (B, C) Representative TEM images of *Z. galactanivorans* cells cultivated in two different KI concentrations. The standard 0.2 μM KI condition is represented on (B) and the 10 μM KI condition is shown by (C). Yellow circles indicate cytoplasmic Zg-*VIPO* and red circles surrounded the peripheral ones. (D) Comparison of the number of immunolabelled proteins detected per cell between standard (in light grey) and 10 μM KI culture condition (in dark grey). (E) Protein ratio of cytoplasmic/peripheral labelling found between standard (in light grey) and 10 μM KI (in dark grey).

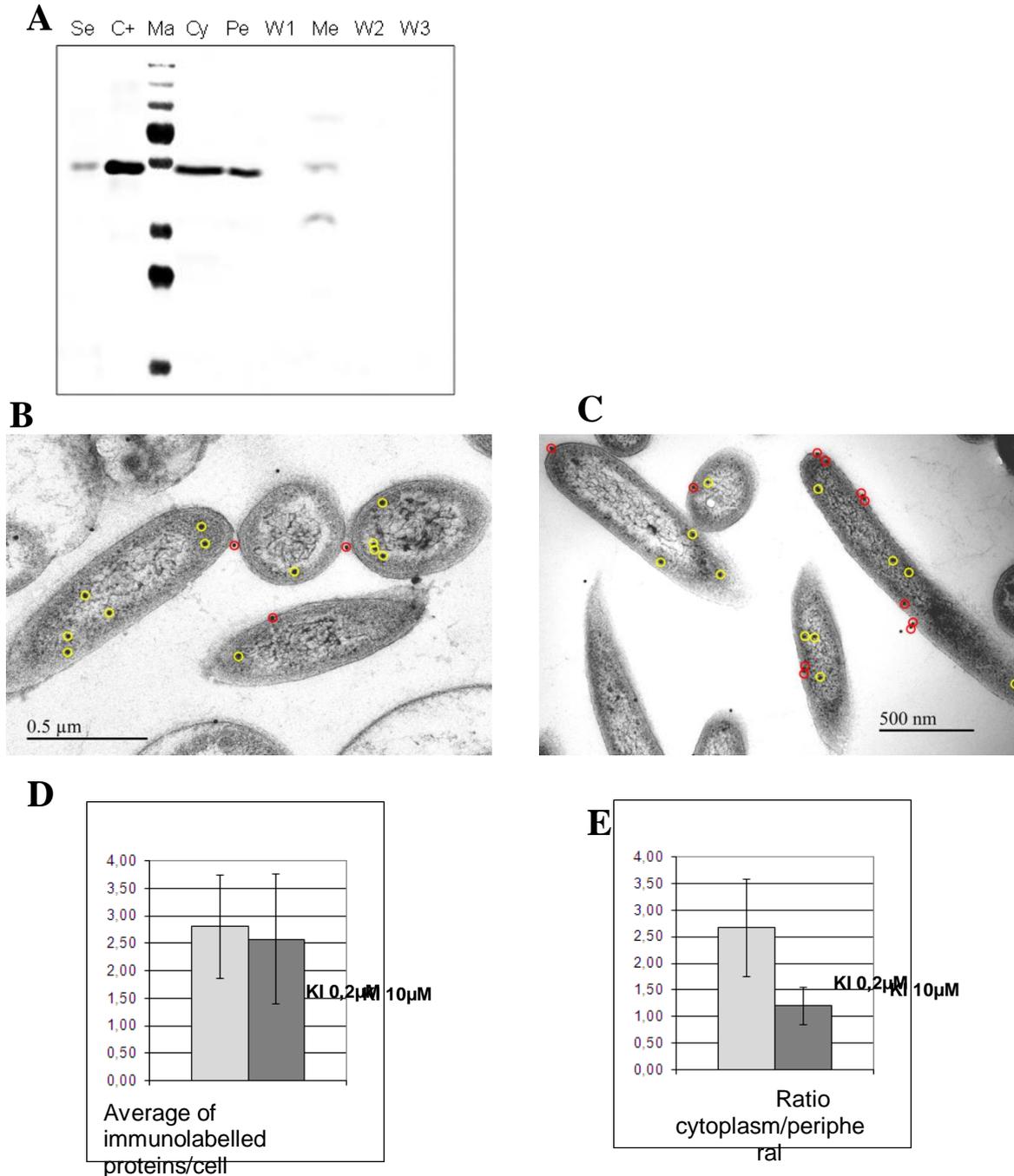


Table 1. Kinetic parameters and melting temperature (T_m) values of recombinant purified VIPO1 and VIPO2 from *Z. galactanivorans*, determined using Thymol Blue assay and dynamic light scattering (DLS) analysis.

<i>Enzyme</i>	<i>Iodide kinetics</i>			<i>DLS analysis</i>
	$K_M^{I^-}$ (mM)	$k_{cat}^{I^-}$ (s ⁻¹)	$k_{cat}^{I^-}/K_M^{I^-}$ (s ⁻¹ .mM ⁻¹)	T_m (°C)
Zg-VIPO1	0.22 ±0.01	1.98±0. 05	9.14	42
Zg-VIPO2	0.22 ±0.02	2.04±0. 08	9.32	36

Table 2. Standard deviation between global 3D structures of different VHPO.

	An-VBPO1 (1QI9)*	Co-VBPO (1QHB)*	Cp-VBPO (1UP8)*	Ci-VCPO (1IDQ)*
Zg-VIPO1	2.608	2.259	2.548	1.791
An-VBPO1	-	1.418	1.633	2.948
Co-VBPO	-	-	0.482	3.164
Cp-VBPO	-	-	-	2.584

PDB accession no.; Zg, *Zobellia galactanivorans*; An, *Ascophyllum nodosum*; Co, *Corallina officinalis*; Cp, *Corallina pilulifera*; Ci, *Curvularia inaequalis*

Supplementary Information.

Materials and methods

Cloning, overexpression and purification of the VHPO proteins

The *Z. galactinovorans* genomic DNA was isolated as described by Barbeyron et al. (2001) and used as a template to amplify the VHPO coding sequences by polymerase chain reaction (PCR) using Pfu DNA polymerase (Promega) (2 min 96 °C ; 35 cycles: 15 s 96 °C, 30 s 60 °C, 6 min 72 °C; 4 min 72 °C). Specific oligonucleotides were designed carrying BamHI and EcoRI (zobellia_1262), or SphI and KpnI (zobellia_2088) sites, corresponding to the 5' and the 3' ends, respectively (Table S1). The zobellia_1262 gene (Zg-VIPO1) PCR amplicon was first cloned into the vector pFO4, a modified expression vector of pET15b (Novagen, USA). The zobellia_2088 gene (Zg-VIPO2) was later cloned into the pQE80L vector (Qiagen), which generates a hexa-histidine tail at the N-terminal of recombinant protein. Both expression vectors were introduced in BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL strain of *E. coli* (Novagen, Darmstadt, Germany) using a protocol described in Groisillier et al. (2010).

The recombinant bacteria were grown in 200 mL auto-inducible ZYP or graffinity medium (consisting in a modified LB medium containing 0.5 % glucose) in presence of 100 µg/mL ampicillin, during 3 days at 20 °C. The bacterial pellet was harvested using a French Press in 50 mM Tris-HCl pH 8.8. After clarification, the supernatant was exchanged with buffer A (Tris-HCl pH 7.5 50 mM, 200 mM NaCl, 50 mM imidazole) and purified by a two-step chromatography protocol using an ÄKTA-purifier (GE Healthcare, USA). The extract was first fractionated by IMAC affinity using a Hisprep FF 16/10 Ni-sepharose column (GE Healthcare, USA). After washing with buffer A, the proteins were eluted using a gradient from 50 mM to 500 mM imidazole by mixing buffer A and buffer B (Tris-HCl pH 7.5 50 mM, 200 mM NaCl, 500 mM imidazole). Coomassie Blue staining method was used to identify the presence of the recombinant protein in the eluted fractions. The protein fractions of interest were finally concentrated by ultrafiltration on a CentriPrep Centrifugal Filter Unit 10 kDa (Millipore) and simultaneously exchanged with a Tris-HCl pH 7.5 50 mM buffer before loading onto a Superdex 200 16/60 Prep Grade resin (Amersham). The protein solution was added with 0.1 mM of VO4.

For crystallization set up and 3D structure resolution, the Se-Met labelling procedure was performed by growing recombinant pFO4-Zg-VIPO1 *E. coli* BL21 (DE3) in 200 ml of PASM 5052 medium (Studier, 2005) containing 200 µg/ml of Ampicillin at 20 °C during 10 days. The purification procedure was the same as for the native enzyme.

The native vanadium-bromoperoxidase I from *Ascophyllum nodosum* (An-VBPO1) was extracted and purified according to H. Vilter (1994), as described in Verhaeghe et al. (2008). Aliquots of purified An-VBPO1 were stored at - 20 °C and kept frozen until use.

Haloperoxidase activities

For screening of protein fractions, the VHPO activities were detected on non-denaturing electrophoresis gels, soaked with 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 in the presence of 0.1 mM o-dianisidine, 0.45 mM H₂O₂, and 10 mM KI, KBr, or KCl in order to reveal iodo-, bromo- or chloroperoxidase activities, respectively (Jordan and Vilter, 1990).

The spectrophotometric assay for the determination of bromo- and iodoperoxidase activities of VHPO is based on the bromo- and iodination of Thymol blue (TB) described by Verhaeghe et al. (2008). All reactions were performed in quadruplicate at 20 °C in clear flat-bottomed 96-wells microplates (Greiner UV-Star 96 well plate). The assays were carried out as followed: 2.5-10 µg of purified proteins were added to the 250 µL reaction mixture, consisting of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2 and pH 7.8 for iodo- and bromoperoxidase assays, respectively), TB (100 µM), KI (80 µM to 2 mM) or KBr (1.5 to 10 mM), and H₂O₂ (0.42 mM and 0.1 mM for iodo- and bromoperoxidase assays, respectively). The absorbance at 620 nm of the resulting mixture was immediately recorded, after the hydrogen peroxide addition on a Spectrophotometer Safire² (Tecan) for 5 min. The A₆₂₀ values were converted to millimolars of diiodothymolsulfonphthalein (TBI₂) using $[TBI_2] = (A_{620} / (40.3 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1} \times 0.71 \text{ cm})) \times 2$. For the determination of kinetic parameters, the experimental initial (up to 112 s) velocities v_i were expressed in mM of I- ($[KI]$ range of 0.125-0.5 mM) converted per minute and the Lineweaver-Burk plots were used to calculate the kinetic parameters K_{MI} - and V_{max} . k_{cat} values were obtained from $k_{cat} = V_{max}/E_t$, where E_t is the final concentration of Zg-VIPO1 and Zg-VIPO2 ($MW_{Zg-VIPO1} = 49,404 \text{ g.mol}^{-1}$ and $MW_{Zg-VIPO2} = 50,500 \text{ g.mol}^{-1}$).

Dynamic light scattering (DLS) analyses

Both recombinant Zg-VIPO proteins were analyzed by dynamic light scattering (DLS), in order to check the purity and study the thermostability of the enzymes. Heating rate was 1 °C/8 min, from 10 to 64 °C. Before

measurements, the protein was centrifuged 1 hour at 13000 g and 4 °C. The sample (120 µL at 1 mg/mL of protein) was transferred to a quartz cuvette. A series of 4 measurements each 1 °C was conducted using a Malvern Zetasizer Nano-S (Malvern Instruments, UK) and a green laser (532 nm) as source, with 2 min intervals for temperature stabilization. The scattered light was collected at a fixed angle of 90° and output data were processed with the program DTS v4.10 by multiple narrow modes, to obtain hydrodynamic radius (Rh) distributions at each temperature, and melting temperatures (T_m). In parallel, recombinant Zg-VIPO1 was incubated at increasing temperature for 10 min before testing the iodoperoxidase activity by TB assay.

Crystallization and data collection

Single crystals of native and Se-Met Zg-VIPO1 were obtained using hanging drops vapor diffusion method at 19 °C. Crystallization drops were composed of 1 µL of enzyme and 0.5 µL of reservoir solution containing 23 % PEG 1150, 100 mM phosphate/citrate pH 4.2 and 2 % glycerol. Prior to data collection crystals were quickly soaked in a cryo solution containing 23 % PEG 1150, 100 mM phosphate/citrate pH 4.2 and 4 % glycerol and flash frozen at 100 K in liquid nitrogen. Multiple anomalous diffraction data were collected at the ESRF (Grenoble, France) on beamline ID23-EH1 at three different wavelengths around the K absorption edge of selenium. The order of data collection was peak: 0.9793 Å, inflection: 0.9796 Å and remote: 0.9685 Å. Beamline ID23-EH1 was equipped with an ADSC Q315R detector. XDS package (Kabsch, 1993) was used for data reduction and scaling. Data collection statistics are presented in Table S2.

Structure determination and refinement

Search of the selenium sites and phasing were done using SHELXD/E (Sheldrick, 2008) via the GUI HKL2MAP (Pape and Schneider, 2004). Initial phase, with a figure of merit of 0.65 were improve by solvent flattening using DM (Cowtan and Main, 1998) and provide an interpretable electron density map with a figure on merit of 0.77. Initial model of Zg-VIPO1 has been automatically built using ARP/WARP (Perrakis et al., 1997). The model was further refined with cycles of positional refinement using the program REFMAC5 (implemented within the CCP4 suite (Winn et al., 2011), alternating with manual rebuilding in COOT (Emsley et al, 2010). General refinement parameters are presented in Table S3. The local 2Fo-Fc electron density maps around the VO4 active site were obtained after 9 runs of refinement with REFMAC5 and 7 building and refinement with COOT. Then one supplementary run of refinement was made with either VO4 or PO4 in the active site. All structure figures were generated with Pymol (Schrodinger, 2010). The standard deviations (Å) between VHPO structures were obtained by the superposition of structures based on the alignment of secondary structures using SUPERPOSE software in the CCP4 suite (Krissinel and Henrick, 2004). The coordinates of the Zg-VIPO1 model and the structure factors have been deposited at the Protein Data Bank with PDB accession code XXXX.

Phylogenetic Analyses

The following protein sequences, which have been characterized at the biochemical level, were used as queries using serial Blast searches in the public databases, i.e. Zg-VIPO1, Zg-VHPO3, VIPO1 of *L. digitata* (Colin et al. 2005), VBPO of *Synechococcus* sp. CC9311 (Johnson et al., 2011), VCPO of *C. inaequalis* (Simons et al. 1995), and NapH3 of *Streptomyces aculeolatus* (Winter et al. 2007). Basic Blast queries were first submitted on nr protein database, restricted to Eukaryota phyla. Blast searches were also conducted using Concise Blast on bacterial complete genomes (www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/prokhits.cgi), in order to reduce the hit redundancy and to get a broader taxonomic representation of bacterial sequences. After eliminating the redundant hits obtained by the different Blast searches, the protein sequences were aligned by MUSCLE (Edgar 2004) and manually filtered based on the presence of amino-acid stretches likely to be involved in the fixation and stabilization of VO4 (KxxxxxxxRP; RxxxGxH). Phylogenetic analyses were then conducted using MEGA version 5.2 (Tamura et al. 2011) with a total of 127 protein sequences (see detailed information in Table S4). Gap positions or missing data were deleted when the site coverage was less than 95 %. The best amino acid substitution model was selected according to the lowest Bayesian Information Criterion. Maximum Likelihood analysis was therefore carried out on 200 aligned amino acids using the WAG model with discrete 5 gamma-distributed rate categories. The tree with the highest log likelihood (-36976.7361) is shown, and bootstrap analyses of 500 replicates were used to provide confidence estimates for the phylogenetic tree topology.

Protein subcellular fractionation

After centrifugation at 12,000×g for 30 min of a 200 mL ZoBell medium culture of *Z. galactanivorans* grown for one week at 20°C in shaking incubator, the supernatant was collected and filtered throw a 0.2 µm filter. The secreted proteins present in this medium were subsequently precipitated using the method described in Cabrita et al., (Talanta, 2010). The supernatant was incubated with 0.2 mg/mL of sodium deoxycholate (DOC) for 30 min at 4 °C, followed by an addition of 10 % (w/v; final) trichloroacetic acid (TCA) and the precipitation

was left five hours at -20 °C. After centrifugation (12,000 ×g, 30 min, 4 °C), the pellet was rinsed with 80 % (w/v; final) ice-cold acetone and then centrifuged (12,000 ×g, 10 min, 4 °C). The pellet was finally dissolved in a proteomic compatible (PC) buffer containing 7 M urea; 2 M thiourea; 2 % CHAPS; 60 mM DTT.

Periplasmic fraction was obtained according to the osmotic shock method of Neu and Heppel (1965). This protocol was adapted for *Z. galactanivorans*. Bacterial cells of a fresh culture were collected by centrifugation. The pellet was diluted to a concentration of 10 mg/mL in sterile seawater containing 1 mM EDTA and centrifuged at 12,000 ×g for 30 min, at 4 °C. This wash was repeated a second time. The breakdown of the outer membrane was performed by the addition of an equal volume of milliQ water containing 5 mM MgSO₄. The cells were treated on ice for 10 min with gently shaking. After centrifugation at 30,000 ×g for 30 min, the supernatant was collected as the periplasmic fraction and the resulting precipitates were gently resuspended in sterile seawater. Following this washing step and another centrifugation at 12,000 ×g for 30 min, the cells were resuspended in a Tris buffer composed by 50 mM Tris-HCl pH7.5, Complete® anti-proteases (Roche), 1 mg/mL lysozyme (Sigma-Aldrich) and 10 U/mL DNaseI (Sigma-Aldrich). The mixture was further sonicated using a sonifier device to achieve the lysis and to release the cytoplasmic content of the bacteria. After centrifugation for 1 h at 35,000 ×g, the supernatant corresponding to the cytoplasm and the precipitate corresponding to the membranes were separated. The latter fraction was washed twice using 50 mL Tris buffer and then the membrane proteins were solubilized in 1 % (w/v; final) Triton X-100 detergent (Sigma-Aldrich).

Finally, all the fractions were evaluated for protein concentration using the Bio-Rad Protein Assay and each fraction (periplasmic space, cytoplasm, membranes) were adjusted with one volume of PC buffer and subjected to SDS-PAGE and immunoblotting analyses. The washing and periplasmic samples exhibiting low protein concentrations were concentrated by ultrafiltration into Centriprep YM10 cells (Millipore) to further adequate analysis. The quality of the subcellular fractions was assessed by LC-MS/MS mass spectrometry.

Western blot analysis

20µg of protein fractions described above were charged on a 12% SDS-PAGE (Bio-Rad system). Following the separation, the proteins were electrotransferred from the polyacrylamide gel to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare). The immunodetection of iodoperoxidase enzymes was realized using a rabbit polyclonal antibody raised against ZgIPO1 recombinant protein produced by Covalab (remerciements?). After blocking 30 min into TBS-T buffer containing 5% of dried milk, the antibody was diluted at 1/5000 in the same buffer and incubated 1h with a gently shaking. It was rinsed 3 times in TBS-T buffer during 10 min before adding the secondary antibody directed against rabbit IgG and coupled to horseradish peroxidase (Bio-Rad) at the final dilution of 1/5000. The membrane was incubated 30 min and washed again 3 times like above. Finally, the detection of protein-antibody interactions were revealed by addition of ECL kit reagents and visualized by a CCD camera using the ChemiCapt software (Vilber Lourmat).

Transmission Electron Microscopy (TEM)

Two 50 mL cultures of *Z. galactanivorans* were grown in parallel, either in ZoBell medium (0.2 µM KI) or in ZoBell medium supplemented with 10 µM KI. The ZoBell medium was made with an artificial seawater protocol (NaCl 0.45 M, KCl 10 mM, CaCl₂ 9 mM, MgCl₂ (6H₂O) 30 mM, MgSO₄ (7H₂O) 16 mM) and adjusted to pH 7.8. After one week at 20°C, the cells were centrifuged and rinsed briefly before fixation.

Bacterial cells were fixed for 4 hours with 4 % formaldehyde and 0.2 % glutaraldehyde in 0.1 M of phosphate buffer pH 7.4. After washes in phosphate buffer with 0.15 M of glycine, the cells were dispersed in 10 % gelatin. After solidification, the pellet can be cut into small blocks at 4°C. Then, the samples were rapidly transferred in the freezing substitution unit at 4 °C for the dehydration steps : alcool 30 % at 4 °C 30 min, alcool 50 % at -20 °C 1 hour, Alcool 70 % 1 h 30 min at -35 °C, alcool 90 % at -35 °C 1h30 and alcool 100 % 2 hours at -35 °C. Then the sample were equilibrated with lowicryl HM20 and alcool 100 % 1:2 for 2 hours and 2:1 for 16 hours, pure Lowicryl HM20 with two changes and again pure Lowicryl HM20 for 24 hours. Finally the capsules were filled up with fresh Lowicryl HM20 and polymerized under UV for 48 hours at -35 °C followed by UV polymerisation at 0 °C for 24 hours. The blocks were sectioned on an ultracut E ultramicrotome.

For immunocytochemical studies, the sections were mounted on Formvar carbonated 200 mesh nickel grids and floated on a plate of 2 % gelatin in 0.1 M phosphate buffer, then warmed for 30 min at 37 °C. The grids were washed with 0.15 M glycine in phosphate buffer. After incubation in drops of 1 % BSA in phosphate buffer the lowicryl sections were incubated overnight with a 1/5 dilution of Anti Z G1PO1 in Phosphate buffer containing 0.5 % BSA and 0.25 % fish gelatin. The antibodies were visualized with protein A gold conjugates (15 nm), (purchased from cell microscopy center, Utrecht, Netherland) 45 min after wash. The sections were washed in Phosphate buffer and distilled water and stained with 2 % uranyl acetate for 10 min and 2 % lead citrate for 3 min. The grids were examined with a Jeol 1400 transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan).

TEM statistical analysis

For quantification of immunogold labelling, ten images of each condition were considered. Only the entire of quasi-entire cells (90% visible) were retained for the counting of gold particles. A total of 65 cells for standard and KI-supplemented conditions were treated. The distribution of proteins was selected either as peripheral (if localized in periplasmic space or in membranes) or cytoplasmic. The comparative results of the 2x10 images were subjected to t-test analyses using a p value <0.01.

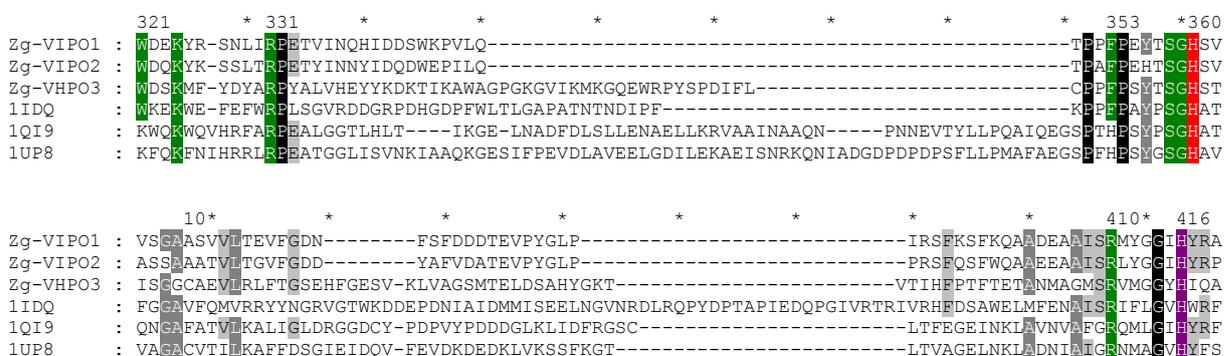
Results

Cloning and primary sequences of vanadium haloperoxidases from *Z. galactanivorans*

Table S1. Sequences of primers used for PCR-based cloning of *Z. galactanivorans* VIPO1 and VIPO2 genes.

Gene name (Genome locus_tag)	ID;	Primer sequences
<i>VIPO1</i> (FP476056 ; zobellia_1262)		forward : 5' GGGGGGGGATCCAAAGCTCCACAAAAAGAAGAACCTAT 3' reverse : 5' CCCCCGAATCCTAGTTTTGGGCTACTTCTTATCGGAT 3'
<i>VIPO2</i> (FP476056 ; zobellia_2088)		forward: 5' ACCATCACGGATCCGCATGCGATACGTATTTGAAGGCGGTTTGTC 3' reverse : 5' GCAGGTCGACCCGGGTACCTCAATGCTCCTTCTTAATCGCTCG 3'

Figure S1. Partial multiple amino acid sequence alignment of vanadium haloperoxidases from *Z. galactanivorans* and other VHPO, showing the conservation of amino acid residues around the VO4 active site.



The conserved residues in all of the four sequences are shown in white capitals on a black background, and the residues that occur in at least two of the sequences are in black or white capitals on a grey background. The amino acid residues involved in the activity and in the coordination of the vanadate cofactor are colored in red for the catalytic Histidine, in purple for the vanadium binding site and in green for those associated with VO4. The numbering is that of Zg-VIPO1 protein.

Abbreviations: Zg-VIPO1, VIPO1 from *Zobellia galactanivorans*; Zg-VIPO2, VIPO2 from *Z. galactanivorans*; Zg-VHPO3, VHPO3 from *Z. galactanivorans*; 1IDQ, VCPO from *C. inaequalis*; 1QI9, VBPO from *A. nodosum*; 1UP8, VBPO from *C. pillulifera*.

Purification and biochemical studies of recombinant Zg-VIPO1 and Zg-VIPO2 proteins.

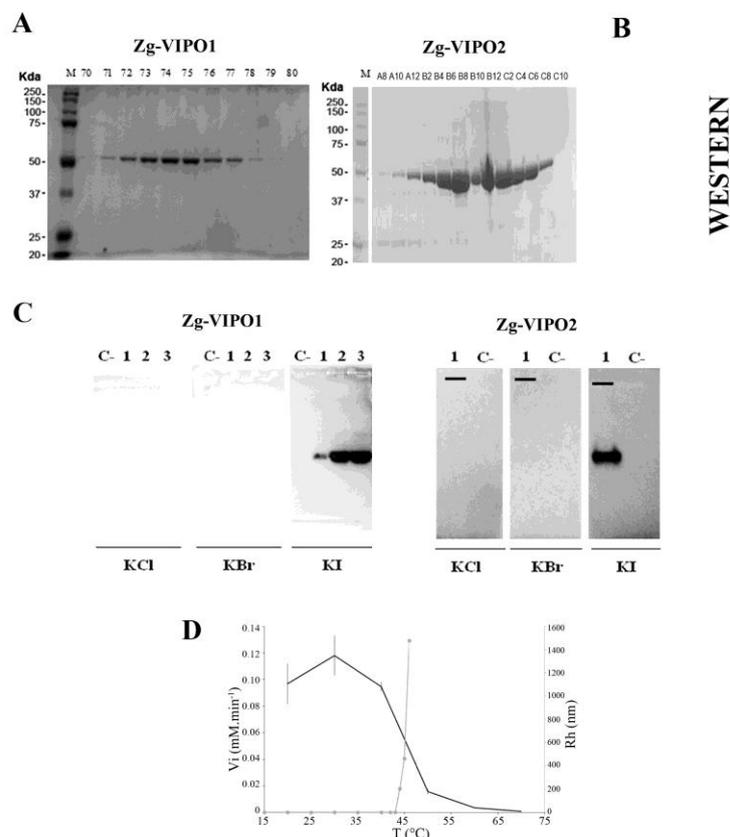
Figure S2.

SDS Polyacrylamide gel electrophoresis analyses of Zg-VIPO1 and Zg-VIPO2, obtained after purification by size and affinity chromatography. The SDS-PAGE gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250, revealing the presence of the recombinant proteins in eluted protein fractions (Lanes 70 to 80 for Zg-VIPO1 and A8 to C10 for Zg-VIPO2). M: Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad Laboratories).

Western Blot hybridizations of purified recombinant Zg-VIPO1 and Zg-VIPO2. Each lane contains XX ng of protein treated with SDS and β-mercaptoethanol. Blots were stained with antibodies directed against recombinant Zg-VIPO1.

In-gel haloperoxidase assay of purified recombinant Zg-VIPO1 and Zg-VIPO2. Non-denaturing Polyacrylamide gels were loaded with MilliQ water (lane C-) as a negative control, and with 1 μL (lane 1), 5 μL (lane 2), and 10 μL (lane 3) of the purified recombinant Zg-VIPO1 or Zg-VIPO2 enzymes and subsequently stained for chloroperoxidase activity (KCl lanes), bromoperoxidase activity (KBr lanes), and iodoperoxidase activity (KI lanes).

Thermostability studies of Zg-VIPO1 enzyme. The effect of temperature increase on Zg-VIPO1 was measured on enzyme iodoperoxidase initial velocity (V_i , black curve) using Thymol blue assay at pH 7.2 and on hydrodynamic radius (Rh, grey curve) using DLS analysis. Error bars indicate standard deviations (n=3).



Structural analyses of Zg-VIPO1 and Zg-VIPO2.

Table S2. Data collection statistics for the MAD data set of Zg-VIPO1

	Peak	Inflexion point	Remote
Wavelength (Å)	0.9793	0.9796	0.9685
Space group		P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Unit cell (Å)	a = 42.84 Å ; b = 84.36 Å ; c = 117.38 Å $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$		
Resolution (Å)	20 - 1.80	20 - 1.80	20 - 1.90
High resolution shell	1.85 - 1.80	1.85 - 1.80	1.95 - 1.90
No. of reflections^a	198076 (72492)	198448 (74005)	168928 (66137)
Completeness (%)	99.1 (99.6)	99.2 (99.7)	99.1 (99.5)
Redundancy	2.6 (2.6)	2.6 (2.6)	2.6 (2.6)
I / σI	13.74 (5.17)	10.91 (2.74)	10.60 (2.52)
R_{sym}	5.3 (20.7)	7.2 (44.2)	8.3 (45.4)

a Values in parentheses concern the high resolution shell.

Table S3. Refinement statistics for the crystal structure of Zg-VIPO1.

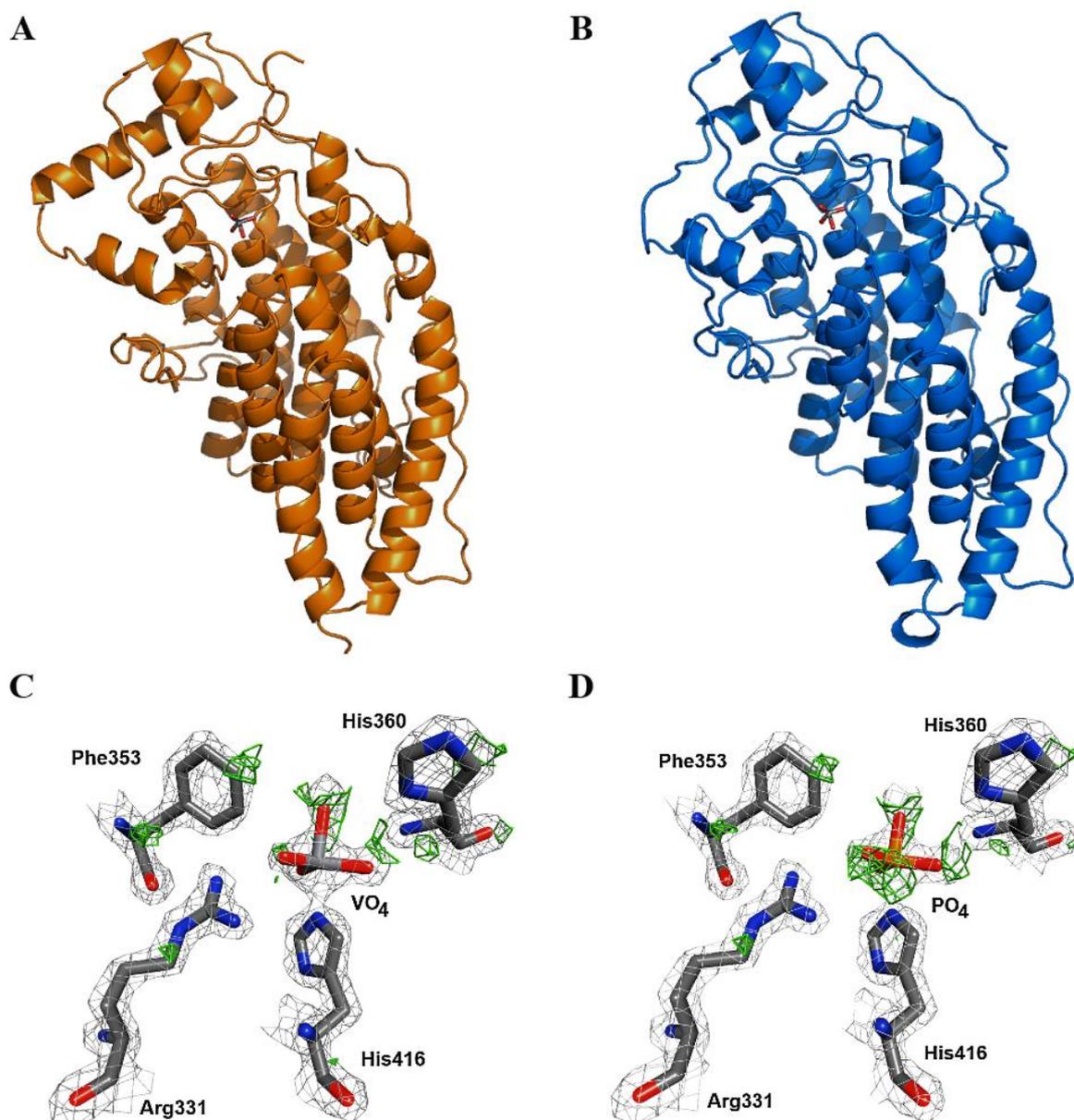
Refinement	
R _{work} (R _{free})	14.0 (18.0)
R.m.s.d. bond lengths (Å)	0.022
R.m.s.d. bond angles (°)	1.93
Ramachandran plot	
Number of residues in most favored region	397 (99.2%)
Number of residues in allowed region	3 (0.8%)
Number of residues in outlier region	0 (0%)
Atom number (Factor B Mean (Å²))	
Protein	3335 (16.52)
Water	307 (26.60)
Co-factor	5 (14.21)
Ion	1 (14.38)

Figure S3.

Overall structure of Zg-VIP01. Zg-VIP01 is represented in cartoon and the vanadate cofactor in stick.

Homology 3D model of Zg-VIP02 monomer, using the structures of the VCPO of *C. inaequalis* (PDB accession number: 1IDQ) and Zg-VIP01 enzymes as templates on the “Swiss Model” server (<http://swissmodel.expasy.org/>).

Electron density maps calculated at the vicinity of the His416 residue of Zg-VIP01 after refinement with VO₄ or (D) PO₄ atoms. Grey maps correspond to the Fourier maps (2Fo-Fc) and green maps are the positive Fourier-difference maps (Fo-Fc), both contoured at a 1 σ level. Selected residues of the active site and cofactors are drawn in stick with atom colors.



Phylogenetic analyses of vanadium-dependent haloperoxidases.

Figure S4. Phylogenetic analysis of VHPO proteins.

Protein maximum likelihood (PML) tree was constructed using a multiple alignment of VHPO from 122 selected eukaryotic and bacterial VHPO and from 5 Bacterial Acid Phosphatases as outgroup. 200 informative residues were used for PML analyses and bootstrap values (500 replicates) are provided when strictly above 65%. The scale bar represents a difference of 0.1 substitutions per site. The corresponding NCBI protein accession numbers are provided in Table S6. When characterized at the biochemical level, the vHPO specificity towards halides is mentioned and refers to the legend code, i.e. iodo- (VIPO), bromo- (VBPO) or chloroperoxidase (VCPO) activity. The available 3D structures of VHPO are indicated by a star.

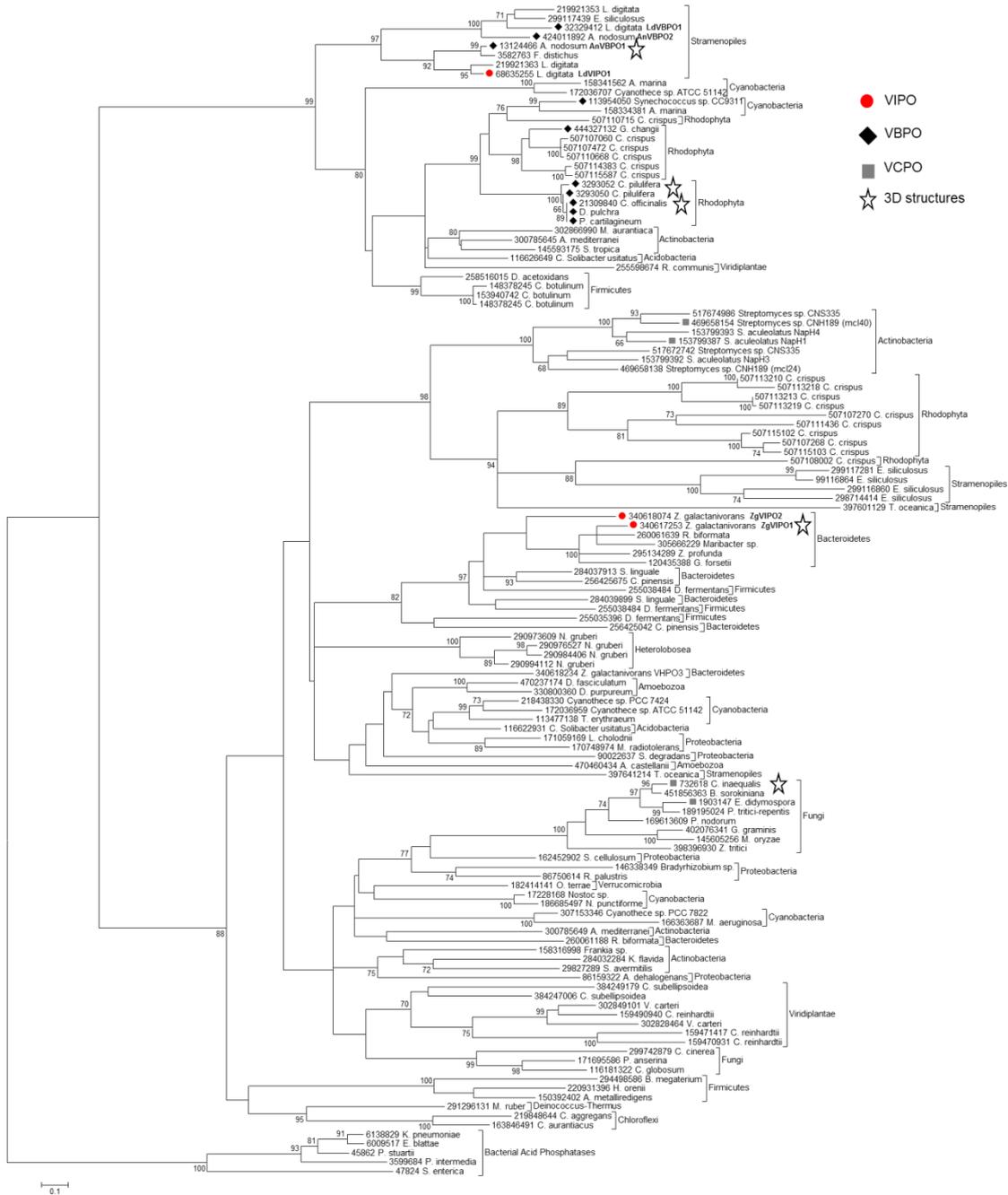


Table S4. List of species and protein accession numbers used in phylogenetic analyses.

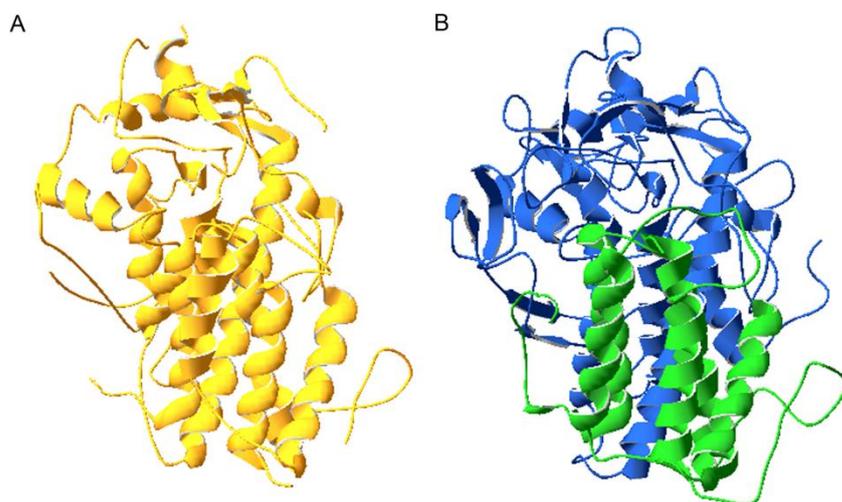
Protein ID	Description	Species	Taxonomy group
gi 116626649 ref YP_828805.1	PA-phosphatase-like phosphoesterase	Candidatus Solibacter usitatus	Bacteria; Acidobacteria
gi 116622931 ref YP_825087.1	hypothetical protein Acid 3833	Candidatus Solibacter usitatus	Bacteria; Acidobacteria
gi 300785649 ref YP_003765940.1	haloperoxidase	Amycolatopsis mediterranei U32	Bacteria; Actinobacteria
gi 300785645 ref YP_003765936.1	phosphoesterase PA-phosphatase-like protein	Amycolatopsis mediterranei U32	Bacteria; Actinobacteria
gi 158316998 ref YP_001509506.1	PA-phosphatase-like phosphoesterase	Frankia sp. EAN1pec	Bacteria; Actinobacteria
gi 284032284 ref YP_003382215.1	phosphoesterase PA-phosphatase related protein	Kribbella flavida DSM 17836	Bacteria; Actinobacteria
gi 302866990 ref YP_003835627.1	phosphoesterase PA-phosphatase-like protein	Micromonospora aurantiaca ATCC 27029	Bacteria; Actinobacteria
gi 145593175 ref YP_001157472.1	PA-phosphatase-like phosphoesterase	Salinispora tropica CNB-440	Bacteria; Actinobacteria
gi 153799393 gb ABS50464.1	NapH4	Streptomyces aculeolatus	Bacteria; Actinobacteria
gi 153799392 gb ABS50463.1	NapH3	Streptomyces aculeolatus	Bacteria; Actinobacteria
gi 153799387 gb ABS50458.1	NapH1	Streptomyces aculeolatus	Bacteria; Actinobacteria
gi 29827289 ref NP_821923.1	hypothetical protein SAV 748	Streptomyces avermitilis MA-4680	Bacteria; Actinobacteria
gi 469658154 gb AGH68925.1	vanadium-dependent haloperoxidase (mcl40 gene)	Streptomyces sp. CNH189	Bacteria; Actinobacteria
gi 469658138 gb AGH68909.1	vanadium-dependent haloperoxidase (mcl24 gene)	Streptomyces sp. CNH189	Bacteria; Actinobacteria
gi 517674986 ref WP_018845194.1	hypothetical protein	Streptomyces sp. CNS335	Bacteria; Actinobacteria
gi 517672742 ref WP_018842950.1	hypothetical protein	Streptomyces sp. CNS335	Bacteria; Actinobacteria
gi 256425675 ref YP_003126328.1	hypothetical protein Cpin 6726	Chitinophaga pinensis DSM 2588	Bacteria; Bacteroidetes
gi 256425042 ref YP_003125695.1	PA-phosphatase-like phosphoesterase	Chitinophaga pinensis DSM 2588	Bacteria; Bacteroidetes
gi 120435388 ref YP_861074.1	vanadium-dependent haloperoxidase	Gramella forsetii KT0803	Bacteria; Bacteroidetes
gi 305666229 ref YP_003862516.1	phosphoesterase PA-phosphatase related protein	Maribacter sp. HTCC2170	Bacteria; Bacteroidetes
gi 3599684 dbj BAA33148.1	acid phosphatase (PIACP)	Prevotella intermedia	Bacteria; Bacteroidetes
gi 260061639 ref YP_003194719.1	PA-phosphatase-like phosphoesterase	Robiginitalea biformata HTCC2501	Bacteria; Bacteroidetes
gi 260061188 ref YP_003194268.1	hypothetical protein RB2501_06305	Robiginitalea biformata HTCC2501	Bacteria; Bacteroidetes
gi 284039899 ref YP_003389829.1	PA-phosphatase-like phosphoesterase	Spirosoma linguale DSM 74	Bacteria; Bacteroidetes
gi 284037913 ref YP_003387843.1	hypothetical protein Slin 3033	Spirosoma linguale DSM 74	Bacteria; Bacteroidetes
gi 340618234 ref YP_004736687.1	vanadium-dependent haloperoxidase	Zobellia galactanivorans	Bacteria; Bacteroidetes
gi 340618074 ref YP_004736527.1	vanadium-dependent haloperoxidase	Zobellia galactanivorans	Bacteria; Bacteroidetes
gi 340617253 ref YP_004735706.1	vanadium-dependent haloperoxidase	Zobellia galactanivorans	Bacteria; Bacteroidetes
gi 295134289 ref YP_003584965.1	acid phosphatase/vanadium-dependent haloperoxidase	Zunongwangia profunda SM-A87	Bacteria; Bacteroidetes
gi 219848644 ref YP_002463077.1	PA-phosphatase-like phosphoesterase	Chloroflexus aggregans DSM 9485	Bacteria; Chloroflexi
gi 163846491 ref YP_001634535.1	PA-phosphatase-like phosphoesterase	Chloroflexus aurantiacus J-10-fl	Bacteria; Chloroflexi
gi 158341562 ref YP_001522726.1	PAP2 superfamily domain-containing protein	Acaryochloris marina MBIC11017	Bacteria; Cyanobacteria
gi 158334381 ref YP_001515553.1	vanadium-dependent bromoperoxidase	Acaryochloris marina MBIC11017	Bacteria; Cyanobacteria
gi 172036959 ref YP_001803460.1	hypothetical protein cce 2044	Cyanothece sp. ATCC 51142	Bacteria; Cyanobacteria
gi 172036707 ref YP_001803208.1	hypothetical protein cce 1792	Cyanothece sp. ATCC 51142	Bacteria; Cyanobacteria
gi 218438330 ref YP_002376659.1	PA-phosphatase-like phosphoesterase	Cyanothece sp. PCC 7424	Bacteria; Cyanobacteria
gi 307153346 ref YP_003888730.1	phosphoesterase PA-phosphatase-like protein	Cyanothece sp. PCC 7822	Bacteria; Cyanobacteria
gi 166363687 ref YP_001655960.1	putative phosphoesterase	Microcystis aeruginosa NIES-843	Bacteria; Cyanobacteria
gi 186685497 ref YP_001868693.1	PA-phosphatase-like phosphoesterase	Nostoc punctiforme PCC 73102	Bacteria; Cyanobacteria
gi 17228168 ref NP_484716.1	hypothetical protein alr0672	Nostoc sp. PCC 7120	Bacteria; Cyanobacteria
gi 113954050 ref YP_731869.1	vanadium-dependent bromoperoxidase 2	Synechococcus sp. CC9311	Bacteria; Cyanobacteria
gi 113477138 ref YP_723199.1	hemolysin-type calcium-binding protein	Trichodesmium erythraeum IMS101	Bacteria; Cyanobacteria
gi 291296131 ref YP_003507529.1	phosphoesterase PA-phosphatase-like protein	Meiothemus ruber DSM 1279	Bacteria; Deinococcus-Thermus
gi 258516015 ref YP_003192237.1	PA-phosphatase like phosphoesterase	Desulfotomaculum acetoxidans DSM 771	Bacteria; Firmicutes
gi 150392402 ref YP_001322451.1	PA-phosphatase-like phosphoesterase	Alkaliphilus metalliredigens QYMF	Bacteria; Firmicutes
gi 294498586 ref YP_003562286.1	hypothetical protein BMQ 1823	Bacillus megaterium QM B1551	Bacteria; Firmicutes
gi 148378245 ref YP_001252786.1	vanadium-dependent haloperoxidase	Clostridium botulinum A str. ATCC 3502	Bacteria; Firmicutes
gi 226947463 ref YP_002802554.1	PAP2 family protein	Clostridium botulinum A2 str. Kyoto	Bacteria; Firmicutes
gi 153940742 ref YP_001389606.1	vanadium-dependent haloperoxidase	Clostridium botulinum F str. Langeland	Bacteria; Firmicutes
gi 255038484 ref YP_003089105.1	vanadium-dependent haloperoxidase family protein	Dyadobacter fermentans DSM 18053	Bacteria; Firmicutes
gi 255038480 ref YP_003089101.1	PA-phosphatase-like phosphodiesterase	Dyadobacter fermentans DSM 18053	Bacteria; Firmicutes
gi 255035396 ref YP_003086017.1	hypothetical protein Dfer 1609	Dyadobacter fermentans DSM 18053	Bacteria; Firmicutes

gi 220931396 ref YP_002508304.1	PA-phosphatase-like phosphoesterase	Halothermothrix orenii H 168	Bacteria; Firmicutes
gi 170748974 ref YP_001755234.1	hypothetical protein Mrad2831 2561	Methylobacterium radiotolerans JCM 2831	Bacteria; Proteobacteria
gi 86159322 ref YP_466107.1	hypothetical protein Adeh 2900	Anaeromyxobacter dehalogenans 2CP-C	Bacteria; Proteobacteria
gi 146338349 ref YP_001203397.1	chloride peroxidase	Bradyrhizobium sp. ORS 278	Bacteria; Proteobacteria
gi 6009517 dbj BAA84942.1	acid phosphatase	Escherichia blattae	Bacteria; Proteobacteria
gi 6138829 emb CAB59725.1	PhoC protein	Klebsiella pneumoniae	Bacteria; Proteobacteria
gi 171059169 ref YP_001791518.1	hypothetical protein Lcho 2488	Leptothrix cholodnii SP-6	Bacteria; Proteobacteria
gi 45862 emb CAA46032.1	PhoN acid phosphatase	Providencia stuartii	Bacteria; Proteobacteria
gi 86750614 ref YP_487110.1	chloride peroxidase	Rhodopseudomonas palustris HaA2	Bacteria; Proteobacteria
gi 90022637 ref YP_528464.1	hypothetical protein Sde 2995	Saccharophagus degradans 2-40	Bacteria; Proteobacteria
gi 47824 emb CAA45144.1	nonspecific acid phosphatase	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium	Bacteria; Proteobacteria
gi 162452902 ref YP_001615269.1	chloride peroxidase	Sorangium cellulosum So ce56	Bacteria; Proteobacteria
gi 182414141 ref YP_001819207.1	PA-phosphatase-like phosphoesterase	Opitutus terrae PB90-1	Bacteria; Verrucomicrobia
gi 470460434 ref XP_004341462.1	hemolysintype calcium-binding region putative	Acanthamoeba castellanii str. Neff	Eukaryota; Amoebozoa
gi 470237174 ref XP_004350544.1	hypothetical protein DFA 11597	Dictyostelium fasciculatum	Eukaryota; Amoebozoa
gi 330800360 ref XP_003288205.1	hypothetical protein DICPUDRAFT 152406	Dictyostelium purpureum	Eukaryota; Amoebozoa
gi 451856363 gb EMD69654.1	hypothetical protein COCSADRAFT 212376	Bipolaris sorokiniana ND90Pr	Eukaryota; Fungi
gi 116181322 ref XP_001220510.1	predicted protein	Chaetomium globosum CBS 148.51	Eukaryota; Fungi
gi 299742879 ref XP_001835393.2	hypothetical protein CC1G 05355	Coprinopsis cinerea okayama 7 130	Eukaryota; Fungi
gi 732618 emb CAA596861	vanadium chloroperoxidase	Curvularia inaequalis	Eukaryota; Fungi
gi 1903147 emb CAA726221	vanadium chloroperoxidase	Embellisia didymospora	Eukaryota; Fungi
gi 402076341 gb EJT71764.1	vanadium chloroperoxidase	Gaeumannomyces graminis var. tritici R3-111a-1	Eukaryota; Fungi
gi 145605256 ref XP_365508.2	hypothetical protein MGG 02210	Magnaporthe oryzae 70-15	Eukaryota; Fungi
gi 169613609 ref XP_001800221.1	hypothetical protein SNOG 09935	Phaeosphaeria nodorum SN15	Eukaryota; Fungi
gi 171695586 ref XP_001912717.1	hypothetical protein	Podospora anserina S mat+	Eukaryota; Fungi
gi 189195024 ref XP_001933850.1	vanadium chloroperoxidase	Pyrenophora tritici-repentis Pt-1C-BFP	Eukaryota; Fungi
gi 398396930 ref XP_003851923.1	hypothetical protein MYCGRDRAFT 86416	Zymoseptoria tritici IPO323	Eukaryota; Fungi
gi 290994112 ref XP_002679676.1	PAP2 haloperoxidase domain-containing protein	Naegleria gruberi	Eukaryota; Heterolobosea
gi 290984406 ref XP_002674918.1	PAP2 haloperoxidase domain-containing protein	Naegleria gruberi	Eukaryota; Heterolobosea
gi 290976527 ref XP_002670991.1	PAP2 haloperoxidase domain-containing protein	Naegleria gruberi	Eukaryota; Heterolobosea
gi 290973609 ref XP_002669540.1	predicted protein	Naegleria gruberi	Eukaryota; Heterolobosea
gi 507115587 emb CDF39041.1	unnamed protein product	Chondrus crispus	Eukaryota; Rhodophyta
gi 507115103 emb CDF38596.1	PAP2-like haloperoxidase	Chondrus crispus	Eukaryota; Rhodophyta
gi 507115102 emb CDF38595.1	PAP2/haloperoxidase-like protein	Chondrus crispus	Eukaryota; Rhodophyta
gi 507114383 emb CDF37939.1	vanadium-dependent bromoperoxidase	Chondrus crispus	Eukaryota; Rhodophyta
gi 507113219 emb CDF36854.1	PAP2/haloperoxidase-like protein	Chondrus crispus	Eukaryota; Rhodophyta
gi 507113218 emb CDF36853.1	PAP2/haloperoxidase-like protein	Chondrus crispus	Eukaryota; Rhodophyta
gi 507113213 emb CDF36848.1	PAP2/haloperoxidase-like protein	Chondrus crispus	Eukaryota; Rhodophyta
gi 507113210 emb CDF36845.1	PAP2/haloperoxidase-like protein	Chondrus crispus	Eukaryota; Rhodophyta
gi 50711436 emb CDF35158.1	unnamed protein product	Chondrus crispus	Eukaryota; Rhodophyta
gi 507110715 emb CDF34463.1	vanadium-dependent bromoperoxidase vBPO	Chondrus crispus	Eukaryota; Rhodophyta
gi 507110668 emb CDF34418.1	vanadium-dependent bromoperoxidase vBPO	Chondrus crispus	Eukaryota; Rhodophyta
gi 507108002 emb CDF41387.1	PAP2/haloperoxidase-like protein	Chondrus crispus	Eukaryota; Rhodophyta
gi 507107472 emb CDF40945.1	unnamed protein product	Chondrus crispus	Eukaryota; Rhodophyta
gi 507107270 emb CDF40783.1	PAP2-like haloperoxidase	Chondrus crispus	Eukaryota; Rhodophyta
gi 507107268 emb CDF40781.1	PAP2-like haloperoxidase	Chondrus crispus	Eukaryota; Rhodophyta
gi 507107060 emb CDF40600.1	vanadium-dependent bromoperoxidase vBPO	Chondrus crispus	Eukaryota; Rhodophyta
gi 21309840 gb AAM46061.1 AF218810.1	vanadium-dependent bromoperoxidase	Corallina officinalis	Eukaryota; Rhodophyta
gi 3293052 dbj BAA31262.1	vanadium-dependent bromoperoxidase 2	Corallina pilulifera	Eukaryota; Rhodophyta
gi 3293050 dbj BAA31261.1	vanadium-dependent bromoperoxidase 1	Corallina pilulifera	Eukaryota; Rhodophyta
nd	vanadium-dependent bromoperoxidase vBPO-D	Delisea pulchra	Eukaryota; Rhodophyta
gi 444327132 gb AGE00855.1	vanadium-dependent bromoperoxidase 1	Gracilaria changii	Eukaryota; Rhodophyta
nd	vanadium-dependent bromoperoxidase	Plocamium cartilagineum	Eukaryota; Rhodophyta
gi 424011892 emb CCD42013.1	vanadium-dependent bromoperoxidase 2	Ascophyllum nodosum	Eukaryota; Stramenopiles
gi 13124466 sp P81701.1 PRXV ASCNO	Vanadium-dependent bromoperoxidase	Ascophyllum nodosum	Eukaryota; Stramenopiles

gi 299117439 emb CBN73942.1	vanadium-dependent bromoperoxidase	Ectocarpus siliculosus	Eukaryota; Stramenopiles
gi 299117281 emb CBN75241.1	conserved unknown protein	Ectocarpus siliculosus	Eukaryota; Stramenopiles
gi 299116864 emb CBN74976.1	conserved unknown protein	Ectocarpus siliculosus	Eukaryota; Stramenopiles
gi 299116860 emb CBN74972.1	conserved unknown protein	Ectocarpus siliculosus	Eukaryota; Stramenopiles
gi 298714414 emb CBJ27471.1	n/a	Ectocarpus siliculosus	Eukaryota; Stramenopiles
gi 3582763 gb AAC35279.1	vanadium bromoperoxidase	Fucus distichus	Eukaryota; Stramenopiles
gi 68635255 emb CAF04025.1	vanadium-dependent iodoperoxidase 1	Laminaria digitata	Eukaryota; Stramenopiles
gi 219921363 emb CAQ51446.1	putative iodoperoxidase 3	Laminaria digitata	Eukaryota; Stramenopiles
gi 219921353 emb CAQ51441.1	putative bromoperoxidase 3	Laminaria digitata	Eukaryota; Stramenopiles
gi 32329412 emb CAD37191.1	vanadium-dependent bromoperoxidase 1	Laminaria digitata	Eukaryota; Stramenopiles
gi 397641214 gb EJK74535.1	hypothetical protein THAOC 03780	Thalassiosira oceanica	Eukaryota; Stramenopiles
gi 397601129 gb EJK57824.1	hypothetical protein THAOC 22095 partial	Thalassiosira oceanica	Eukaryota; Stramenopiles
gi 159490940 ref XP_001703431.1	haloperoxidase-like protein	Chlamydomonas reinhardtii	Eukaryota; Viridiplantae
gi 159471417 ref XP_001693853.1	predicted protein	Chlamydomonas reinhardtii	Eukaryota; Viridiplantae
gi 159470931 ref XP_001693610.1	predicted protein	Chlamydomonas reinhardtii	Eukaryota; Viridiplantae
gi 384249179 gb EIE22661.1	hypothetical protein COCSUDRAFT 42315	Coccomyxa subellipsoidea C-169	Eukaryota; Viridiplantae
gi 384247006 gb EIE20494.1	acid phosphatase/Vanadium-dependent haloperoxidase	Coccomyxa subellipsoidea C-169	Eukaryota; Viridiplantae
gi 255598674 ref XP_002537057.1	conserved hypothetical protein	Ricinus communis	Eukaryota; Viridiplantae
gi 302849101 ref XP_002956081.1	hypothetical protein VOLCADRAFT 107068	Volvox carteri f. nagariensis	Eukaryota; Viridiplantae
gi 302828464 ref XP_002945799.1	hypothetical protein VOLCADRAFT 127323	Volvox carteri f. nagariensis	Eukaryota; Viridiplantae

(*) For *Delisea pulchra* and *Plocamium cartilagineum* the sequences were directly obtained from the paper of Sandy et al. ChemComm 2011.

Figure S5. Homology 3D model of (A) NapH1 from *Streptomyces aculeolatus* (GB accession number ABS50458), using the structure of (B) VCPO from *Curvularia inaequalis* (Ci-VCPO, PDB accession no. 1IDQ) as template on the “Swiss Model” server (<http://swissmodel.expasy.org/>). In Ci-VCPO, as in Fig. 2, the conserved helices between all VHPO are represented in blue and the first bundle helices (numbered 1-5) are colored in green. The monomers are drawn in 3D representations.



- Agatsuma Y, Endo H, Taniguchi K. 2008. Inhibitory effect of 2,4-dibromophenol and 2,4,6-tribromophenol on larval survival and metamorphosis of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Fisheries Science* 74, 837–841.
- Almeida M, Filipe S, Humanes M, Maia MF, Melo R, Severino N, da Silva J a, Fraústo da Silva JJ, Wever R. 2001. Vanadium haloperoxidases from brown algae of the Laminariaceae family. *Phytochemistry* 57, 633–42.
- Almeida M, Humanes M, Melo R. 2000. Purification and characterisation of vanadium haloperoxidases from the brown alga *Pelvetia canaliculata*. *Phytochemistry* 54, 5–11.
- Amachi S. 2008. Microbial Contribution to Global Iodine Cycling: Volatilization, Accumulation, Reduction, Oxidation, and Sorption of Iodine. *Microbes and Environments* 23, 269–276.
- Amachi S, Kamagata Y, Kanagawa T, Muramatsu Y. 2001. Bacteria mediate methylation of iodine in marine and terrestrial environments. *Applied and environmental microbiology* 67, 2718–22.
- Amachi S, Kasahara M, Hanada S, Kamagata Y, Shinoyama H, Fujii T, Muramatsu Y. 2003. Microbial participation in iodine volatilization from soils. *Environmental science & technology* 37, 3885–90.
- Amachi S, Kawaguchi N, Muramatsu Y, Tsuchiya S, Watanabe Y, Shinoyama H, Fujii T. 2007a. Dissimilatory iodate reduction by marine *Pseudomonas* sp. strain SCT. *Applied and environmental microbiology* 73, 5725–30.
- Amachi S, Kimura K, Muramatsu Y, Shinoyama H, Fujii T. 2007b. Hydrogen Peroxide-Dependent Uptake of Iodine by Marine. *Flavobacteriaceae* bacterium strain C-21. *Applied and environmental microbiology* 73, 7536–41.
- Amachi S, Minami K, Miyasaka I, Fukunaga S. 2010. Ability of anaerobic microorganisms to associate with iodine: 125I tracer experiments using laboratory strains and enriched microbial communities from subsurface formation water. *Chemosphere* 79, 349–54.
- Amachi S, Mishima Y, Shinoyama H, Muramatsu Y, Fujii T. 2005a. Active Transport and Accumulation of Iodide by Newly Isolated Marine Bacteria. *Applied and environmental microbiology* 71, 741–745.
- Amachi S, Muramatsu Y, Akiyama Y, Miyazaki K, Yoshiki S, Hanada S, Kamagata Y, Ban-nai T, Shinoyama H, Fujii T. 2005b. Isolation of iodide-oxidizing bacteria from iodide-rich natural gas brines and seawaters. *Microbial ecology* 49, 547–57.
- Ankudinov AL, Rehr JJ, Conradson SD. 1998. Real-space multiple-scattering calculation and interpretation of x-ray-absorption near-edge structure. *Physical Review B* 58, 7565–7576.
- Arakawa Y, Akiyama Y, Furukawa H, Suda W, Amachi S. 2012. Growth stimulation of iodide-oxidizing α -Proteobacteria in iodide-rich environments. *Microbial ecology* 63, 522–31.
- Arber J, De Boer E, Garner CD, Hasnain S, Wever R. 1989. Vanadium K-edge X-ray absorption spectroscopy of bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Biochemistry* 28, 7968–7973.
- Arnoldsson K, Andersson PL, Haglund P. 2012. Formation of environmentally relevant brominated dioxins from 2,4,6,-tribromophenol via bromoperoxidase-catalyzed dimerization. *Environmental science & technology* 46, 7239–44.
- Baharum H, Chu W-C, Teo S-S, Ng K-Y, Rahim RA, Ho C-L. 2013. Molecular cloning, homology modeling and site-directed mutagenesis of vanadium-dependent bromoperoxidase (GcVBPO1) from *Gracilaria changii* (Rhodophyta). *Phytochemistry*.
- Baker AR. 2005. Marine Aerosol Iodine Chemistry: The Importance of Soluble Organic Iodine. *Environmental Chemistry* 2, 295.
- Baker AR, Turner SM, Broadgate WJ, Thompson A, McFiggans GB, Vesperini O, Nightingale PD, Liss PS, Jickells TD. 2000. Distribution and sea-air fluxes of biogenic trace gases in the eastern Atlantic Ocean. *Global Biogeochemical Cycles* 14, 871.
- Ban-nai T, Muramatsu Y, Amachi S. 2006. Rate of iodine volatilization and accumulation by filamentous fungi through laboratory cultures. *Chemosphere* 65, 2216–22.
- Barbeyron T, L'Haridon S, Corre E, Kloareg B, Potin P. 2001. *Zobellia galactanovorans* gen. nov., sp. nov., a marine species of Flavobacteriaceae isolated from a red alga, and classification of [*Cytophaga*] *uliginosa* (ZoBell and Upham 1944) Reichenbach 1989 as *Zobellia uliginosa* gen. nov., comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 51, 985–97.

- Barnett P, Hemrika W, Dekker HL, Muijsers a O, Renirie R, Wever R. 1998. Isolation, characterization, and primary structure of the vanadium chloroperoxidase from the fungus *Embellisia didymospora*. *The Journal of biological chemistry* 273, 23381–7.
- La Barre S, Potin P, Leblanc C, Delage L. 2010. The halogenated metabolism of brown algae (Phaeophyta), its biological importance and its environmental significance. *Marine drugs* 8, 988–1010.
- Barton N, Briggs D, Eisin J, Goldstein D, Patel N. 2007. *Evolution*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Berger RS. 1972. 2,6-Dichlorophenol, Sex Pheromone of the Lone Star Tick. *Science* 177, 704–705.
- Berglin M, Delage L, Potin P, Vilter H, Elwing H. 2004. Enzymatic cross-linking of a phenolic polymer extracted from the marine alga *Fucus serratus*. *Biomacromolecules* 5, 2376–83.
- Bernhardt P, Okino T, Winter JM, Miyanaga A, Moore BS. 2011. A stereoselective vanadium-dependent chloroperoxidase in bacterial antibiotic biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* 133, 4268–70.
- Berry MJ, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR. 1991. Selenocysteine Confers the Biochemical Properties Characteristic of the Type. , 14155–14158.
- Bianco AC, Kim BW. 2006. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. 116.
- Bitton R, Ben-Yehuda M, Davidovich M, Balazs Y, Potin P, Delage L, Colin C, Bianco-Peled H. 2006. Structure of algal-born phenolic polymeric adhesives. *Macromolecular bioscience* 6, 737–46.
- Bobrowski N, Hönninger G, Galle B, Platt U. 2003. Detection of bromine monoxide in a volcanic plume. *Nature* 423, 273–276.
- De Boer E, Keijzers CP, Klaassen AAK, Reijerse EJ, Collison D, Garner CD, Wever R. 1988. 14N-coordination to VO₂⁺ in reduced vanadium bromoperoxidase, an electron spin echo study. *FEBS letters* 235, 93–97.
- De Boer E, van Kooyk Y, Tromp MGM, Plat H, Wever R. 1986. Bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*: a novel class of enzymes containing vanadium as a prosthetic group? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 869, 48–53.
- De Boer E, Plat H, Tromp MG, Wever R, Franssen MC, van der Plas HC, Meijer EM, Schoemaker HE. 1987. Vanadium containing bromoperoxidase: An example of an oxidoreductase with high operational stability in aqueous and organic media. *Biotechnology and bioengineering* 30, 607–10.
- De Boer E, Wever R. 1988. The reaction mechanism of the novel vanadium-bromoperoxidase. A steady-state kinetic analysis. *The Journal of biological chemistry* 263, 12326–32.
- Buss JM, McTamney PM, Rokita SE. 2012. Expression of a soluble form of iodotyrosine deiodinase for active site characterization by engineering the native membrane protein from *Mus musculus*. *Protein science: a publication of the Protein Society* 21, 351–61.
- Butler A. 1999. Mechanistic considerations of the vanadium haloperoxidases. *Coordination Chemistry Reviews* 187, 17–35.
- Butler A, Sandy M. 2009. Mechanistic considerations of halogenating enzymes. *Nature* 460, 848–854.
- Carpenter LJ, Malin G, Liss PS, Küpper FC. 2000. Novel biogenic iodine-containing trihalomethanes and other short-lived halocarbons in the coastal east Atlantic. *Global Biogeochemical Cycles* 14, 1191–1204.
- Carter JN, Beatty KE, Simpson MT, Butler A. 2002. Reactivity of recombinant and mutant vanadium bromoperoxidase from the red alga *Corallina officinalis*. *Journal of inorganic biochemistry* 91, 59–69.
- Carter-Franklin JN, Butler A. 2004. Vanadium bromoperoxidase-catalyzed biosynthesis of halogenated marine natural products. *Journal of the American Chemical Society* 126, 15060–6.
- Carter-Franklin JN, Parrish JD, Tschirret-Guth R a, Little RD, Butler A. 2003. Vanadium haloperoxidase-catalyzed bromination and cyclization of terpenes. *Journal of the American Chemical Society* 125, 3688–9.
- Chance R, Malin G, Jickells T, Baker AR. 2007. Reduction of iodate to iodide by cold water diatom cultures. *Marine Chemistry* 105, 169–180.

- Chino Y, Saito M, Yamasu K, Suyemitsu T, Ishihara K. 1994. Formation of the adult rudiment of sea urchins is influenced by thyroid hormones. *Developmental biology* 161, 1–11.
- Christmann U, Dau H, Haumann M, Kiss E, Liebisch P, Rehder D, Santoni G, Schulzke C. 2004. Substrate binding to vanadate-dependent bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*: a vanadium K-edge XAS approach. *Dalton transactions*, 2534–40.
- Cock JM, Sterck L, Rouzé P, Scornet D, Allen AE, Amoutzias G, Anthouard V, Artiguenave F, Aury J-M, Badger JH, et al. 2010. The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature* 465, 617–21.
- Colin C, Leblanc C, Michel G, Wagner E, Leize-Wagner E, Van Dorselaer A, Potin P. 2005. Vanadium-dependent iodoperoxidases in *Laminaria digitata*, a novel biochemical function diverging from brown algal bromoperoxidases. *Journal of biological inorganic chemistry* 10, 156–66.
- Colin C, Leblanc C, Wagner E, Delage L, Leize-Wagner E, Van Dorselaer A, Kloareg B, Potin P. 2003. The brown algal kelp *Laminaria digitata* features distinct bromoperoxidase and iodoperoxidase activities. *The Journal of biological chemistry* 278, 23545–52.
- Collén J, Porcel B, Carré W, Ball SG, Chaparro C, Tonon T, Barbeyron T, Michel G, Noel B, Valentin K, et al. 2013. Genome structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 5247–52.
- Collet-Descotils H-V. 1805. Analyse de la mine brune de plomb de Zimapan, dans le royaume du Mexique, envoyée par M. Humboldt, et dans laquelle M Del Rio di avoir découvert un nouveau métal. *Annale de Chimie* 53, 268–271.
- Colpas GJ, Hamstra BJ, Kampf JW, Pecoraro VL. 1996. Functional Models for Vanadium Haloperoxidase: Reactivity and Mechanism of Halide Oxidation. *Journal of the American Chemical Society* 118, 3469–3478.
- Cooper RA. 2007. Iodine revisited. *International wound journal* 4, 124–37.
- Council TB, Landa ER, Lovley DR. 1997. Microbial reduction of iodate. , 99–106.
- Courtois B. 1813. Découverte d'une substance nouvelle dans le Vareck. *Ann. Chim.* 88, 304–310.
- Crans DC, Smee JJ, Gaidamauskas E, Yang L. 2004. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chemical reviews* 104, 849–902.
- Dau H, Dittmer J, Eppele M, Hanss J, Kiss E, Rehder D, Schulzke C, Vilter H. 1999. Bromine K-edge EXAFS studies of bromide binding to bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*. *FEBS letters* 457, 237–40.
- Delage L, Leblanc C, Michel G, Rebuffet E, Czjzek M, Potin P. 2013. BACTERIAL IODOPEROXIDASES FROM *Zobellia galactanivorans*, METHODS OF PREPARATION AND USES THEREOF.
- Ehrlich J, Bartz QR, Smith RM, Joslyn DA, Burkholder PR. 1947. Chloromycetin, a New Antibiotic From a Soil Actinomycete. *Science (New York, N.Y.)* 106, 417.
- Everett R. 1990. Mechanism of Dioxygen Formation catalyzed by Bromoperoxidase. *Journal of Biological Chemistry* 265, 15671–15679.
- Everett RR, Kanofsky JR, Butler A. 1990a. Mechanistic investigations of the novel non-heme vanadium bromoperoxidases. Evidence for singlet oxygen production. *The Journal of biological chemistry* 265, 4908–14.
- Everett RR, Soedjak HS, Butler A. 1990b. Mechanism of dioxygen formation catalyzed by vanadium bromoperoxidase. Steady state kinetic analysis and comparison to the mechanism of bromination. *The Journal of biological chemistry* 265, 15671–9.
- Farrenkopf AM, Dollhopf ME, Chadhain SN, Luther GW, Neilson KH. 1997a. Reduction of iodate in seawater during Arabian Sea shipboard incubations and in laboratory cultures of the marine bacterium *Shewanella putrefaciens* strain MR-4. *Marine Chemistry* 57, 347–354.
- Farrenkopf AM, Luther GW, Truesdale VW, Van Der Weijden CH. 1997b. Sub-surface iodide maxima: evidence for biologically catalyzed redox cycling in Arabian Sea OMZ during the SW intermonsoon. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 44, 1391–1409.
- Feiters MC, Küpper FC, Meyer-Klaucke W. 2005a. X-ray absorption spectroscopic studies on model compounds for biological iodine and bromine. *Journal of synchrotron radiation* 12, 85–93.

- Feiters MC, Leblanc C, Küpper FC, Meyer-Klaucke W, Michel G, Potin P. 2005b. Bromine is an endogenous component of a vanadium bromoperoxidase. *Journal of the American Chemical Society* 127, 15340–1.
- Fetzner S. 1998. Bacterial dehalogenation. *Applied microbiology and biotechnology* 50, 633–57.
- Fieschi F, Nivière V, Frier C, Décout JL, Fontecave M. 1995. The mechanism and substrate specificity of the NADPH:flavin oxidoreductase from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 270, 30392–400.
- Finster KW, Herbert RA, Lomstein BA. 2009. *Spirosoma spitsbergense* sp. nov. and *Spirosoma luteum* sp. nov., isolated from a high Arctic permafrost soil, and emended description of the genus *Spirosoma*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 59, 839–44.
- Friedman JE, Watson J a, Lam DW-H, Rokita SE. 2006. Iodotyrosine deiodinase is the first mammalian member of the NADH oxidase/flavin reductase superfamily. *The Journal of biological chemistry* 281, 2812–9.
- Fujimoto K, Matsuura K, Das B, Fu L, Shi Y-B. 2012. Direct activation of *Xenopus* iodotyrosine deiodinase by thyroid hormone receptor in the remodeling intestine during amphibian metamorphosis. *Endocrinology* 153, 5082–9.
- Fuse H, Inoue H, Murakami K, Takimura O, Yamaoka Y. 2003. Production of free and organic iodine by *Roseovarius* spp. *FEMS Microbiology Letters* 229, 189–194.
- Gall EA, Küpper FC, Kloareg B. 2004. A survey of iodine content in *Laminaria digitata*. *Botanica Marina* 47.
- Garcia-Rodriguez E, Ohshiro T, Aibara T, Izumi Y, Littlechild J. 2005. Enhancing effect of calcium and vanadium ions on thermal stability of bromoperoxidase from *Corallina pilulifera*. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 10, 275–82.
- Garland JA. 1981. Emission of Iodine From the Sea Surface in the Presence of Ozone. *Journal of Geophysical Research* 86, 3183–3186.
- Gay-Lussac J. 1813a. Sur un nouvel acide formé avec la substance découverte par M. Courtois. *Ann. Chim.* 88, 311–318.
- Gay-Lussac J. 1813b. Sur la combinaison de l'iode avec l'oxygène. *Ann. Chim.* 88, 319–321.
- Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang S a, Simonides WS, Zeöld A, Bianco AC. 2008. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocrine reviews* 29, 898–938.
- Goswami A, Rosenberg IN. 1979. Characterization of a flavoprotein iodotyrosine deiodinase from bovine thyroid. Flavin nucleotide binding and oxidation-reduction properties. *The Journal of biological chemistry* 254, 12326–30.
- Gozlan RS, Margalith P. 1973. Iodide oxidation by a marine bacterium. *The Journal of applied bacteriology* 36, 407–17.
- Gozlan RS, Margalith P. 1974. Iodide oxidation by *Pseudomonas iodooxidans*. *The Journal of applied bacteriology* 37, 493–9.
- Gribble GW. 2003. The diversity of naturally produced organohalogenes. *Chemosphere* 52, 289–97.
- Gribble GW. 2012. Occurrence of halogenated alkaloids. In: Knölker H-J, ed. *The Alkaloids. Chemistry and biology*. Elsevier, 1–142.
- Groisillier A, Hervé C, Jeudy A, Rebuffet E, Pluchon PF, Chevolut Y, Flament D, Geslin C, Morgado IM, Power D, et al. 2010. MARINE-EXPRESS: taking advantage of high throughput cloning and expression strategies for the post-genomic analysis of marine organisms. *Microbial cell factories* 9, 45.
- Hager LP, Morris DR, Brown FS, Eberwein H. 1966. Chloroperoxidase. II. Utilization of halogen anions. *The Journal of biological chemistry* 241, 1769–77.
- Hallmeier KH, Szargan R, Werner G, Meier R, Sheromov MA. 1986. Investigation of K-edge absorption spectra of vanadium coordination compounds. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* 42, 841–844.
- Hamstra BJ, Colpas GJ, Pecoraro VL. 1998. Reactivity of Dioxovanadium(V) Complexes with Hydrogen Peroxide: Implications for Vanadium Haloperoxidase. *Inorganic Chemistry* 37, 949–955.

- Harder T, Campbell AH, Egan S, Steinberg PD. 2012. Chemical mediation of ternary interactions between marine holobionts and their environment as exemplified by the red alga *Delisea pulchra*. *Journal of chemical ecology* 38, 442–50.
- Hartung J, Brücher O, Hach D, Schulz H, Vilter H, Ruick G. 2008. Bromoperoxidase activity and vanadium level of the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* 69, 2826–30.
- Hasan Z, Renirie R, Kerkman R, Ruijsenaars HJ, Hartog AF, Wever R. 2006. Laboratory-evolved vanadium chloroperoxidase exhibits 100-fold higher halogenating activity at alkaline pH: catalytic effects from first and second coordination sphere mutations. *The Journal of biological chemistry* 281, 9738–44.
- Hellsten U, Harland RM, Gilchrist MJ, Hendrix D, Jurka J, Kapitonov V, Ovcharenko I, Putnam NH, Shu S, Taher L, et al. 2010. The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science (New York, N.Y.)* 328, 633–6.
- Hemrika W, Renirie R, Dekker HL, Barnett P, Wever R. 1997. From phosphatases to vanadium peroxidases: a similar architecture of the active site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2145–9.
- Hemrika W, Renirie R, Macedo-Ribeiro S, Messerschmidt A, Wever R. 1999. Heterologous expression of the vanadium-containing chloroperoxidase from *Curvularia inaequalis* in *Saccharomyces cerevisiae* and site-directed mutagenesis of the active site residues His(496), Lys(353), Arg(360), and Arg(490). *The Journal of biological chemistry* 274, 23820–7.
- Heyland A, Reitzel AM, Hodin J. 2004. Thyroid hormones determine developmental mode in sand dollars (Echinodermata: Echinoidea). *Evolution & development* 6, 382–92.
- Hormes J, Kuetgens U, Chauvistre R, Schreiber W, Anders N, Vilter H, Rehder D, Weidemann C. 1988. Vanadium K-edge absorption spectrum of bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Biochimica et biophysica acta* 956, 293–9.
- Ishikawa K, Mihara Y, Gondoh K, Suzuki E, Asano Y. 2000. X-ray structures of a novel acid phosphatase from *Escherichia blattae* and its complex with the transition-state analog molybdate. *The EMBO journal* 19, 2412–23.
- Isupov MN, Dalby a R, Brindley a a, Izumi Y, Tanabe T, Murshudov GN, Littlechild J a. 2000. Crystal structure of dodecameric vanadium-dependent bromoperoxidase from the red algae *Corallina officinalis*. *Journal of molecular biology* 299, 1035–49.
- Itoh N. 1997. Volatile halogenated compounds from marine algae; their formation mechanisms and geochemical aspects. *Recent Res. Dev. Phytochem* 1, 309–327.
- Itoh N, Izumi Y, Yamada H. 1986. Characterization of nonheme type bromoperoxidase in *Corallina pilulifera*. *The Journal of biological chemistry* 261, 5194–200.
- Itoh N, Sasaki H, Ohsawa N, Shibata MS, Miura J. 1996. Bromoperoxidase in *Corallina pilulifera* is regulated by its vanadate content. *Phytochemistry* 42, 277–281.
- Itoh N, Shinya M. 1994. Seasonal evolution of bromomethanes from coralline algae (Corallinaceae) and its effect on atmospheric ozone. *Marine Chemistry* 45, 95–103.
- Jeandel C, Caisso M, Minster JJ. 1987. Vanadium behaviour in the global ocean and in the Mediterranean sea. *Marine Chemistry* 21, 51–74.
- Johnson TL, Palenik B, Brahmsha B. 2011. Characterization of a functional Vanadium-dependent bromoperoxidase in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. CC93111. *Journal of Phycology* 47, 792–801.
- Jordan P, Vilter H. 1991. Extraction of proteins from material rich in anionic mucilages: partition and fractionation of vanadate-dependent bromoperoxidases from the brown algae *Laminaria digitata* and *L. saccharina* in aqueous polymer two-phase systems. *Biochimica et biophysica acta* 1073, 98–106.
- Kaysser L, Bernhardt P, Nam S-J, Loesgen S, Ruby JG, Skewes-Cox P, Jensen PR, Fenical W, Moore BS. 2012. Merochlorins A-D, cyclic meroterpenoid antibiotics biosynthesized in divergent pathways with vanadium-dependent chloroperoxidases. *Journal of the American Chemical Society* 134, 11988–91.
- Kimblin C, Bu X, Butler A. 2002. Modeling the catalytic site of vanadium bromoperoxidase: synthesis and structural characterization of intramolecularly H-bonded vanadium(V) oxoperoxo

- complexes, [VO(O(2))((NH)₂pyg(2))]K and [VO(O(2))((BrNH)₂pyg(2))]K. *Inorganic chemistry* 41, 161–3.
- Kloareg B, Quatrano RS. 1988. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *OCEANOGRAPHY AND MARINE BIOLOGY: AN ANNUAL REVIEW*, vol. 26.259–315.
- Kostenko a. V., Feiters M, Kravtsova a. N, Soldatov a. V., Kostenko, Feiters K& S. 2008. Determination of the local atomic structure of the active center of bromoperoxidase protein via the analysis of X-ray absorption spectra. *Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques* 2, 900–903.
- Krenn BE, Plat H, Wever R. 1988. Purification and some characteristics of a non-haem bromoperoxidase from *Streptomyces aureofaciens*. *Biochimica et biophysica acta* 952, 255–60.
- Krenn BE, Tromp MGM, Wevers R. 1989. The Brown Alga *Ascophyllum nodosum* Contains Two Different Vanadium Bromoperoxidases *. *Society* 264, 19287–19292.
- Küpper FC, Carpenter LJ, Leblanc C, Toyama C, Uchida Y, Maskrey BH, Robinson J, Verhaeghe EF, Malin G, Luther GW, et al. 2013. In vivo speciation studies and antioxidant properties of bromine in *Laminaria digitata* reinforce the significance of iodine accumulation for kelps. *Journal of Experimental Botany* 64, 2653–2664.
- Küpper FC, Carpenter LJ, McFiggans GB, Palmer CJ, Waite TJ, Boneberg E-M, Woitsch S, Weiller M, Abela R, Grolimund D, et al. 2008. Iodide accumulation provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 6954–8.
- Küpper FC, Gaquerel E, Boneberg E-M, Morath S, Salaün J-P, Potin P. 2006. Early events in the perception of lipopolysaccharides in the brown alga *Laminaria digitata* include an oxidative burst and activation of fatty acid oxidation cascades. *Journal of experimental botany* 57, 1991–9.
- Küpper FC, Kloareg B, Guern J, Potin P. 2001. Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *Plant physiology* 125, 278–91.
- Küpper FC, Müller DG, Peters AF, Kloareg B, Potin P. 2002. Oligoalginat recognition and oxidative burst play a key role in natural and induced resistance of sporophytes of laminariales. *Journal of chemical ecology* 28, 2057–81.
- Küpper F, Schweigert N, Ar Gall E, Legendre JM, Vilter H, Kloareg B. 1998. Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide. *Planta* 207, 163–171.
- Küsthardt U, Hedman B, Hodgson K, Hahn R, Yilter H. 1993. High-resolution XANES studies on vanadium-containing haloperoxidase: pH-dependence and substrate binding. *FEBS Letters* 329, 5–8.
- De la Quadra R. 1803. Introducción a las tablas comparativas de las substancias metálicas. *Anales de Ciencias Naturales* 6, 1 – 46.
- Latham H. 2008. Temperature stress-induced bleaching of the coralline alga *Corallina officinalis*: a role for the enzyme bromoperoxidase. *Bioscience Horizons* 1, 104–113.
- Laternus F, Svensson T, Wiencke C, Oberg G. 2004. Ultraviolet radiation affects emission of ozone-depleting substances by marine macroalgae: results from a laboratory incubation study. *Environmental science & technology* 38, 6605–9.
- Leblanc C, Colin C, Cosse A, Delage L, La Barre S, Morin P, Fiévet B, Voiseux C, Ambroise Y, Verhaeghe E, et al. 2006. Iodine transfers in the coastal marine environment: the key role of brown algae and of their vanadium-dependent haloperoxidases. *Biochimie* 88, 1773–85.
- Lee RE. 2008. *Phycology*. Cambridge University Press.
- Lee C, Kim YJ, Tanimoto H, Bobrowski N, Platt U, Mori T, Yamamoto K, Hong CS. 2005. High ClO and ozone depletion observed in the plume of Sakurajima volcano, Japan. *Geophysical Research Letters* 32, L21809.
- Lee JD, McFiggans G, Allan JD, Baker a. R, Ball SM, Benton a. K, Carpenter LJ, Commane R, Finley BD, Evans M, et al. 2010. Reactive Halogens in the Marine Boundary Layer (RHaMBLe): the tropical North Atlantic experiments. *Atmospheric Chemistry and Physics* 10, 1031–1055.

- Lei KJ, Pan CJ, Liu JL, Shelly LL, Chou JY. 1995. Structure-function analysis of human glucose-6-phosphatase, the enzyme deficient in glycogen storage disease type 1a. *The Journal of biological chemistry* 270, 11882–6.
- Lindqvist Y, Schneider G, Vihko P. 1994. Crystal structures of rat acid phosphatase complexed with the transition-state analogs vanadate and molybdate. Implications for the reaction mechanism. *European journal of biochemistry* 221, 139–42.
- Littlechild J, Garcia Rodriguez E, Isupov M. 2009. Vanadium containing bromoperoxidase--insights into the enzymatic mechanism using X-ray crystallography. *Journal of inorganic biochemistry* 103, 617–21.
- Littlechild J, Garcia-Rodriguez E. 2003. Structural studies on the dodecameric vanadium bromoperoxidase from *Corallina* species. *Coordination chemistry reviews* 237, 65–76.
- Macedo-Ribeiro S, Hemrika W, Renirie R, Wever R, Messerschmidt A. 1999a. X-ray crystal structures of active site mutants of the vanadium-containing chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *Journal of biological inorganic chemistry* 4, 209–19.
- Macedo-Ribeiro S, Hemrika W, Renirie R, Wever R, Messerschmidt A. 1999b. X-ray crystal structures of active site mutants of the vanadium-containing chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 4, 209–19.
- Macedo-Ribeiro S, Renirie R, Wever R, Messerschmidt A. 2008. Crystal structure of a trapped phosphate intermediate in vanadium apochloroperoxidase catalyzing a dephosphorylation reaction. *Biochemistry* 47, 929–34.
- Mahajan a. S, Plane JMC, Oetjen H, Mendes L, Saunders RW, Saiz-Lopez A, Jones CE, Carpenter LJ, McFiggans GB. 2010. Measurement and modelling of tropospheric reactive halogen species over the tropical Atlantic Ocean. *Atmospheric Chemistry and Physics* 10, 4611–4624.
- Makde RD, Mahajan SK, Kumar V. 2007. Structure and mutational analysis of the PhoN protein of *Salmonella typhimurium* provide insight into mechanistic details. *Biochemistry* 46, 2079–90.
- Martino M, Mills GP, Woeltjen J, Liss PS. 2009. A new source of volatile organoiodine compounds in surface seawater. *Geophysical Research Letters* 36, L01609.
- Messerschmidt A, Prade L, Wever R. 1997. Implications for the catalytic mechanism of the vanadium-containing enzyme chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis* by X-ray structures of the native and peroxide form. *Biological chemistry* 378, 309–15.
- Messerschmidt a, Wever R. 1996. X-ray structure of a vanadium-containing enzyme: chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 392–6.
- Messerschmidt A, Wever R. 1998. X-ray structures of apo and tungstate derivatives of vanadium chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *Inorganica Chimica Acta* 273, 160–166.
- Metrangolo P, Neukirch H, Pilati T, Resnati G. 2005. Halogen bonding based recognition processes: a world parallel to hydrogen bonding. *Accounts of chemical research* 38, 386–95.
- Millero FJ. 2007. The marine inorganic carbon cycle. *Chemical reviews* 107, 308–41.
- Moore SL, Payne DN. 2004. Types of Antimicrobial Agents. In: Fraiese AP, Lambert PA, Maillard J-Y, eds. *Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 8–97.
- Moore RM, Webb M, Tokarczyk R, Wever R. 1996. Bromoperoxidase and iodoperoxidase enzymes and production of halogenated methanes in marine diatom cultures. *Journal of Geophysical Research* 101, 20899.
- Muramatsu Y, Hans Wedepohl K. 1998. The distribution of iodine in the earth's crust. *Chemical Geology* 147, 201–216.
- Neuwald AF. 1997. An unexpected structural relationship between integral membrane phosphatases and soluble haloperoxidases. *Protein science* 6, 1764–7.
- O'Dowd C, Jimenez J, Bahreini R, Flagan R. 2002. Marine aerosol formation from biogenic iodine emissions. *Nature* 417, 632–636.

- Ohsawa N, Ogata Y, Okada N, Itoh N. 2001. Physiological function of bromoperoxidase in the red marine alga, *Corallina pilulifera*: production of bromoform as an allelochemical and the simultaneous elimination of hydrogen peroxide. *Phytochemistry* 58, 683–92.
- Ohshiro T, Littlechild J, Garcia-Rodriguez E, Isupov MN, Iida Y, Kobayashi T, Izumi Y. 2004. Modification of halogen specificity of a vanadium-dependent bromoperoxidase. *Protein science: a publication of the Protein Society* 13, 1566–71.
- Ortiz-Bermúdez P. 2003. Chlorination and cleavage of lignin structures by fungal chloroperoxidases. *Applied and ...* 69, 5015–5018.
- Ortiz-Bermúdez P, Hirth KC, Srebotnik E, Hammel KE. 2007. Chlorination of lignin by ubiquitous fungi has a likely role in global organochlorine production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 3895–900.
- Palmer CJ, Anders TL, Carpenter LJ, Küpper FC, McFiggans GB. 2005. Iodine and Halocarbon Response of *Laminaria digitata* to Oxidative Stress and Links to Atmospheric New Particle Production. *Environmental Chemistry* 2, 282.
- Paul N, de Nys R, Steinberg P. 2006. Chemical defence against bacteria in the red alga *Asparagopsis armata*: linking structure with function. *Marine Ecology Progress Series* 306, 87–101.
- Paul C, Pohnert G. 2011. Interactions of the algicidal bacterium *Kordia algicida* with diatoms: regulated protease excretion for specific algal lysis. *PLoS one* 6, e21032.
- Van Pée KH, Lingens F. 1984. Detection of a bromoperoxidase in *Streptomyces phaeochromogenes*. *FEBS letters* 173, 5–8.
- Van Pée KH, Unversucht S. 2003. Biological dehalogenation and halogenation reactions. *Chemosphere* 52, 299–312.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods* 8, 785–6.
- Plat H, Krenn BE, Wever R. 1987. The bromoperoxidase from the lichen *Xanthoria parietina* is a novel vanadium enzyme. *The Biochemical journal* 248, 277–9.
- Podzelinska K, Latimer R, Bhattacharya A, Vining LC, Zechel DL, Jia Z. 2010. Chloramphenicol biosynthesis: the structure of CmlS, a flavin-dependent halogenase showing a covalent flavin-aspartate bond. *Journal of molecular biology* 397, 316–31.
- Potin P, Sanseau A, Le Gall Y, Rochas C, Kloareg B. 1991. Purification and characterization of a new kappa-carrageenase from a marine Cytophaga-like bacterium. *The Federation of European Biochemical Societies Journal* 201, 241–247.
- Punyani S, Narayana P, Singh H, Vasudevan P. 2006. Iodine based water disinfection: A review. *Journal of Scientific & Industrial Research* 65, 116–120.
- Putnam NH, Butts T, Ferrier DEK, Furlong RF, Hellsten U, Kawashima T, Robinson-Rechavi M, Shoguchi E, Terry A, Yu J-K, et al. 2008. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* 453, 1064–71.
- Ravel B, Newville M. 2005. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *Journal of synchrotron radiation* 12, 537–41.
- Read K a, Mahajan AS, Carpenter LJ, Evans MJ, Faria BVE, Heard DE, Hopkins JR, Lee JD, Moller SJ, Lewis AC, et al. 2008. Extensive halogen-mediated ozone destruction over the tropical Atlantic Ocean. *Nature* 453, 1232–5.
- Rebuffet E. 2010. Etude structurale et fonctionnelle de glycoside hydrolases et d'une iodo-péroxydase de la flavobactérie marine *Zobellia galactanivorans*, impliquées dans l'interaction avec les algues.
- Redruello B, Louro B, Anjos L, Silva N, Greenwell RS, Canario AVM, Power DM. 2010. CRTAC1 homolog proteins are conserved from cyanobacteria to man and secreted by the teleost fish pituitary gland. *Gene* 456, 1–14.
- Rehder D, Casný M, Grosse R. 2004. A vanadium-51 NMR study of the binding of vanadate and peroxovanadate to proteins. *Magnetic resonance in chemistry* 42, 745–9.
- Rehder D, Hoist H, Priebisch W. 1991. Vanadate-dependent bromo/iodoperoxidase from *ascophyllum nodosum* also contains unspecific low-affinity binding sites for vanadate (V): A 51V NMR investigation, including the model peptides Phe-Glu and Gly-Tyr. *Journal of Inorganic Biochemistry* 41, 171–185.

- Renirie R, Charnock JM, Garner CD, Wever R. 2010. Vanadium K-edge XAS studies on the native and peroxy-forms of vanadium chloroperoxidase from *Curvularia inaequalis*. *Journal of inorganic biochemistry* 104, 657–64.
- Renirie R, Hemrika W, Piersma SR, Wever R. 2000a. Cofactor and substrate binding to vanadium chloroperoxidase determined by UV-VIS spectroscopy and evidence for high affinity for pervanadate. *Biochemistry* 39, 1133–41.
- Renirie R, Hemrika W, Wever R. 2000b. Peroxidase and Phosphatase Activity of Active-site Mutants of Vanadium Chloroperoxidase from the Fungus *Curvularia inaequalis* IMPLICATIONS FOR THE. *Journal of Biological Chemistry* 275, 11650–11657.
- Rosenberg IN, Goswami A. 1979. Purification and characterization of a flavoprotein from bovine thyroid with iodotyrosine deiodinase activity. *The Journal of biological chemistry* 254, 12318–25.
- Saiz-Lopez A, Plane JMC, Baker AR, Carpenter LJ, von Glasow R, Martín JCG, McFiggans G, Saunders RW. 2012. Atmospheric chemistry of iodine. *Chemical reviews* 112, 1773–804.
- Saiz-Lopez A, Shillito JA, Coe H, Plane JMC. 2006. Measurements and modelling of I₂, IO, OIO, BrO and NO₃ in the mid-latitude marine boundary layer. *Atmospheric Chemistry and Physics* 6, 1513–1528.
- Salaun S. 2009. Interactions entre la macroalgue brune *Laminaria digitata* et ses épibiontes bactériens: Etudes moléculaire et spectroscopiques, et capacité d'adhésion et de formation de biofilm.
- Salgado LT, Cinelli LP, Viana NB, Tomazetto de Carvalho R, de Souza Mourão PA, Teixeira VL, Farina M, Filho and GMA. 2009. A Vanadium bromoperoxidase catalyzes the formation of high-molecular-weight complexes between brown algal phenolic substances and alginates. *Journal of Phycology* 45, 193–202.
- Sandy M, Carter-Franklin JN, Martin JD, Butler A. 2011. Vanadium bromoperoxidase from *Delisea pulchra*: enzyme-catalyzed formation of bromofuranone and attendant disruption of quorum sensing. *Chemical communications (Cambridge, England)* 47, 12086–8.
- Van Schijndel JW, Barnett P, Roelse J, Vollenbroek EG, Wever R. 1994. The stability and steady-state kinetics of vanadium chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *European journal of biochemistry* 225, 151–7.
- Van Schijndel JW, Simons LH, Vollenbroek EG, Wever R. 1993. The vanadium chloroperoxidase from the fungus, *Curvularia inaequalis*. Evidence for the involvement of a histidine residue in the binding of vanadate. *FEBS letters* 336, 239–42.
- Seki M, Oikawa J, Taguchi T, Ohnuki T, Muramatsu Y, Sakamoto K, Amachi S. 2013. Laccase-catalyzed oxidation of iodide and formation of organically bound iodine in soils. *Environmental science & technology* 47, 390–7.
- Sheffield DJ, Harry T, Smith AJ, Rogers LJ. 1992. Purification and characterization of the vanadium bromoperoxidase from the macroalga *Corallina officinalis*. *Phytochemistry* 32, 21–26.
- Sheffield DJ, Smith AJ, Harry R. 1993. Thermostability of the vanadium bromoperoxidase from *Corallina officinalis*. *Biochemical Society Transactions*.445s.
- Shimonishi M, Kuwamoto S, Inoue H, Wever R, Ohshiro T, Izumi Y, Tanabe T. 1998. Cloning and expression of the gene for a vanadium-dependent bromoperoxidase from a marine macroalga, *Corallina pilulifera*. *FEBS letters* 428, 105–10.
- Simon R, Tietge JE, Michalke B, Degitz S, Schramm KW. 2002. Iodine species and the endocrine system: thyroid hormone levels in adult *Danio rerio* and developing *Xenopus laevis*. *Analytical and bioanalytical chemistry* 372, 481–5.
- Simons BH, Barnett P, Vollenbroek EG, Dekker HL, Muijsers a O, Messerschmidt A, Wever R. 1995. Primary structure and characterization of the vanadium chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *European journal of biochemistry* 229, 566–74.
- Smith DR, Gruschow S, Goss RJ. 2013. Scope and potential of halogenases in biosynthetic applications. *Current opinion in chemical biology* 17, 276–83.
- Soedjak HS, Butler A. 1990. Characterization of vanadium bromoperoxidase from *Macrocystis* and *Fucus*: reactivity of vanadium bromoperoxidase toward acyl and alkyl peroxides and bromination of amines. *Biochemistry* 29, 7974–7981.

- Soedjak HS, Walker J V., Butler A. 1995. Inhibition and inactivation of vanadium bromoperoxidase by the substrate hydrogen peroxide and further mechanistic studies. *Biochemistry* 34, 12689–96.
- Spokes LJ, Liss PS. 1996. Photochemically induced redox reactions in seawater, II. Nitrogen and iodine. *Marine Chemistry* 54, 1–10.
- Steck E, Bräun J, Pelttari K, Kadel S, Kalbacher H, Richter W. 2007. Chondrocyte secreted CRTAC1: a glycosylated extracellular matrix molecule of human articular cartilage. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology* 26, 30–41.
- Studier FW. 2005. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification* 41, 207–234.
- Stukey J, Carman GM. 1997. Identification of a novel phosphatase sequence motif. *Protein science* 6, 469–72.
- Suzuki M, Eda Y, Ohsawa S, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Tanaka K, Muramatsu Y, Yoshikawa J, Sato I, Fujii T, et al. 2012. Iodide oxidation by a novel multicopper oxidase from the alphaproteobacterium strain Q-1. *Applied and environmental microbiology* 78, 3941–9.
- Takeno N. 2005. Atlas of Eh-pH diagrams. Intercomparison of thermodynamic databases.
- Tanaka N, Dumay V, Liao Q, Lange AJ, Wever R. 2002. Bromoperoxidase activity of vanadate-substituted acid phosphatases from *Shigella flexneri* and *Salmonella enterica* ser. typhimurium. *European Journal of Biochemistry* 269, 2162–2167.
- Tanaka N, Hasan Z, Hartog AF, van Herk T, Wever R, Sanders R-J. 2003a. Phosphorylation and dephosphorylation of polyhydroxy compounds by class A bacterial acid phosphatases. *Organic & biomolecular chemistry* 1, 2833–9.
- Tanaka N, Hasan Z, Wever R. 2003b. Kinetic characterization of active site mutants Ser402Ala and Phe397His of vanadium chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *Inorganica Chimica Acta* 356, 288–296.
- Thomas SR, McTamney PM, Adler JM, Laronde-Leblanc N, Rokita SE. 2009. Crystal structure of iodotyrosine deiodinase, a novel flavoprotein responsible for iodide salvage in thyroid glands. *The Journal of biological chemistry* 284, 19659–67.
- Tiwari A, Panigrahi SK. 2007. HBAT: a complete package for analysing strong and weak hydrogen bonds in macromolecular crystal structures. *In silico biology* 7, 651–61.
- Tromp MG, Olafsson G, Krenn BE, Wever R. 1990. Some structural aspects of vanadium bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1040, 192–198.
- Tromp M, Van TT, Wever R. 1991. Reactivation of vanadium bromoperoxidase; inhibition by metallofluoric compounds. *Biochimica et biophysica acta* 1079, 53–6.
- Ullah AH, Sethumadhavan K, Mullaney EJ. 2011. Vanadate inhibition of fungal PhyA and bacterial AppA2 histidine acid phosphatases. *Journal of agricultural and food chemistry* 59, 1739–43.
- Vaillancourt FH, Yeh E, Vosburg DA, Garneau-Tsodikova S, Walsh CT. 2006. Nature's inventory of halogenation catalysts: oxidative strategies predominate. *Chemical reviews* 106, 3364–78.
- Vaillancourt FH, Yin J, Walsh CT. 2005. SyrB2 in syringomycin E biosynthesis is a nonheme FeII alpha-ketoglutarate- and O₂-dependent halogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10111–6.
- Verhaeghe E, Buisson D, Zekri E, Leblanc C, Potin P, Ambroise Y. 2008a. A colorimetric assay for steady-state analyses of iodo- and bromoperoxidase activities. *Analytical biochemistry* 379, 60–5.
- Verhaeghe EF, Fraysse A, Guerquin-Kern J-L, Wu T-D, Devès G, Mioskowski C, Leblanc C, Ortega R, Ambroise Y, Potin P. 2008b. Microchemical imaging of iodine distribution in the brown alga *Laminaria digitata* suggests a new mechanism for its accumulation. *Journal of biological inorganic chemistry* 13, 257–69.
- Vescina CM, Sálice VC, Cortizo a M, Etcheverry SB. 1996. Effect of vanadium compounds on acid phosphatase activity. *Biological trace element research* 53, 185–91.
- Vilter H. 1983a. Peroxidases from Phaeophyceae. III: Catalysis of Halogenation by Peroxidases from *Ascophyllum nodosum* (L.) *Le Jol. Botanica Marina* 26.

- Vilter H. 1983b. Peroxidases from Phaeophyceae IV. Fractionation and Location of Peroxidase Isoenzymes in *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. *Botanica Marina* 26.
- Vilter H. 1984. Peroxidases from phaeophyceae: A Vanadium(V)-dependent peroxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* 23, 1387–1390.
- Vilter H. 1994. Extraction of proteins from sources containin tannins and anionic mucilages. *Methods in enzymology* 228, 665–672.
- Vilter H. 1995. Vanadium-dependent haloperoxidases. *Metal ions in biological systems* 31, 325–62.
- Vilter H, Rehder D. 1987. 51V NMR Investigation of a vanadate(V)-dependent peroxidase from *ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. *Inorganica Chimica Acta* 136, L7–L10.
- Vreeland V, Ng KL, Epstein L. 1998. cDNA sequence and active recombinant vanadium bromoperoxidase from *Fucus* embryos. *Mol. Biol. Cell.* 9, 1041.
- Wagner C, Molitor IM, König GM. 2008. Critical view on the monochlorodimedone assay utilized to detect haloperoxidase activity. *Phytochemistry* 69, 323–32.
- Watson J a, McTamney PM, Adler JM, Rokita SE. 2008. Flavoprotein iodotyrosine deiodinase functions without cysteine residues. *Chembiochem* 9, 504–6.
- Watson J a, McTamney PM, Adler JM, Rokita SE. 2009. Flavoprotein iodotyrosine deiodinase functions without cysteine residues. - Supporting Information. *Chembiochem* 9.
- Wever R, Krenn BE, De Boer E, Offenbergh H, Plat H. 1988. Structure and function of vanadium-containing bromoperoxidases. *Progress in clinical and biological research* 274, 477–93.
- Wever R, Plat H, de Boer E. 1985. Isolation procedure and some properties of the bromoperoxidase from the seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 830, 181–186.
- Weyand M, Hecht H, Kieb M, Liaud M, Vilter H, Schomburg D, Kiess M. 1999. X-ray structure determination of a vanadium-dependent haloperoxidase from *Ascophyllum nodosum* at 2.0 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 293, 595–611.
- Wilcken R, Zimmermann MO, Lange A, Joerger AC, Boeckler FM. 2013. Principles and applications of halogen bonding in medicinal chemistry and chemical biology. *Journal of medicinal chemistry* 56, 1363–88.
- Winter MGE, Butler A. 1996. Inactivation of vanadium bromoperoxidase: formation of 2-oxohistidine. *Biochemistry* 35, 11805–11.
- Winter JM, Moffitt MC, Zazopoulos E, McAlpine JB, Dorrestein PC, Moore BS. 2007. Molecular basis for chloronium-mediated meroterpene cyclization: cloning, sequencing, and heterologous expression of the napyradiomycin biosynthetic gene cluster. *The Journal of biological chemistry* 282, 16362–8.
- Winter JM, Moore BS. 2009. Exploring the chemistry and biology of vanadium-dependent haloperoxidases. *The Journal of biological chemistry* 284, 18577–81.
- Wischang D, Hartung J. 2011. Parameters for bromination of pyrroles in bromoperoxidase-catalyzed oxidations. *Tetrahedron* 67, 4048–4054.
- Wischang D, Radlow M, Schulz H, Vilter H, Viehweger L, Altmeyer MO, Kegler C, Herrmann J, Müller R, Gaillard F, et al. 2012. Molecular Cloning, Structure, and Reactivity of the Second Bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Bioorganic Chemistry*.
- Wong GT. 1991. The marine geochemistry of iodine. *Reviews in Aquatic Sciences* 4, 45–73.
- Wong GT., Cheng X-H. 2001. The formation of iodide in inshore waters from the photochemical decomposition of dissolved organic iodine. *Marine Chemistry* 74, 53–64.
- Wong GTF, Cheng X-H. 2008. Dissolved inorganic and organic iodine in the Chesapeake Bay and adjacent Atlantic waters: Speciation changes through an estuarine system. *Marine Chemistry* 111, 221–232.
- Wong J, Messmer RP, Maylotte DH. 1984. K-edge absorption spectra of selected vanadium compounds. *Physical Review B* 30, 5596–5610.
- Wong G, Piumsomboon A, Dunstan W. 2002. The transformation of iodate to iodide in marine phytoplankton cultures. *Marine Ecology Progress Series* 237, 27–39.
- Yamada H, Itoh N, Murakami S, Izumi Y. 1985. New Bromoperoxidase from Coralline Algae that Brominates Phenol Compounds. *Agricultural and Biological Chemistry* 49, 2961–2967.

- Zampella G, Fantucci P, Pecoraro VL, De Gioia L. 2005. Reactivity of peroxy forms of the vanadium haloperoxidase cofactor. A DFT investigation. *Journal of the American Chemical Society* 127, 953–960.
- Zampella G, Kravitz JY, Webster CE, Fantucci P, Hall MB, Carlson H a, Pecoraro VL, De Luca L. 2004. Quantum mechanical models of the resting state of the vanadium-dependent haloperoxidase. *Inorganic chemistry* 43, 4127–36.
- Zhan S, Merlin C, Boore JL, Reppert SM. 2011. The monarch butterfly genome yields insights into long-distance migration. *Cell* 147, 1171–85.
- Zhang J, Roberge C, Reddy J, Connors N, Chartrain M, Buckland B, Greasham R. 1999. Bioconversion of indene to trans -2S , 1S- bromoindanol and 1S , 2R-indene oxide by a bromoperoxidase / dehydrogenase preparation from *Curvularia protuberata* MF5400. *Enzyme and Microbial Technology* 24, 86–95.

Résumé :

Dans le milieu marin, les émissions biogéniques de composés iodés jouent un rôle essentiel dans le cycle biogéochimique de l'iode. Cependant les processus enzymatiques responsables de l'absorption, du stockage ou de la synthèse de métabolites iodés restent mal connus chez les organismes marins, et plus encore chez les bactéries. Plusieurs gènes, potentiellement impliqués dans le métabolisme de l'iode, ont été identifiés dans le génome de la bactérie marine, *Zobellia galactanivorans*, dont celui codant une iodoperoxydase à vanadium (VIPO), enzyme spécifique de l'oxydation des iodures.

La partie principale du projet de thèse a consisté à comprendre les mécanismes moléculaires contrôlant la spécificité pour certains halogénures des haloperoxydases à vanadium, en étudiant la VIPO de *Z. galactanivorans* par des approches de mutagenèse dirigée et de biologie structurale. Les douze enzymes mutantes produites et caractérisées au niveau biochimique montrent soit une perte d'activité, soit des modifications de leurs propriétés catalytiques, soit encore une faible activité bromoperoxydase. Les enzymes sauvage et mutantes ont également été étudiées par diffraction et absorption des rayons X, afin de relier les modifications structurales à leurs propriétés catalytiques. Les résultats suggèrent que le principal facteur modulant la spécificité chez ces enzymes est le potentiel d'oxydoréduction de l'intermédiaire réactionnel, le peroxovanadate.

Des analyses biochimiques ont aussi été entreprises pour deux autres protéines identifiées sur le génome de *Z. galactanivorans*. La première protéine s'est révélée être une seconde VIPO. Pour la deuxième protéine, similaire à une iodotyrosine déiodinase, l'activité biochimique reste encore à être caractérisée. *Z. galactanivorans* posséderait plusieurs enzymes pouvant oxyder l'iodure, ainsi qu'une permettant de cliver les liaisons C-I. En parallèle à ce travail, la localisation et la spéciation de l'iode ont été étudiées par imagerie chimique chez *Z. galactanivorans* et chez l'algue brune, *Laminaria digitata*, connue pour ses fortes teneurs en iode.

Les résultats de ce travail apportent un nouvel éclairage sur les mécanismes contrôlant la spécificité des haloperoxydases à vanadium envers les halogénures, et également sur l'origine bactérienne de cette famille d'enzymes. Plus globalement, ces études permettent de mieux appréhender le rôle du métabolisme de l'iode chez certaines bactéries marines et leurs importances dans le cycle biogéochimique de l'iode.

Abstract :

In marine environment, biogenic emissions of iodinated compounds play an essential role in biogeochemical cycle of iodine. Nevertheless, enzymatic process involved in absorption and storage of iodine or in the synthesis of iodinated compounds are unknown marine organisms, especially in bacteria. Several genes, potentially involved in iodine metabolism, have been identified in the genome of a marine bacterium, *Zobellia galactanivorans*. One of these genes codes for a vanadium iodoperoxydase (VIPO), an enzyme specific of iodide oxidation.

The main part of the thesis project was to understand molecular mechanisms controlling the specificity vanadium haloperoxydase (VHPO) for some halide, by studying the VIPO from *Z. galactanivorans* by directed mutagenesis and structural biology. To lead this project, twelve mutated enzymes were produced and characterized at biochemical level. For some of them, mutations lead to a loss of activity or to modification of catalytic properties or to a slight VBPO activity. The wild type enzyme and three mutants were also analyzed by X ray absorption and diffraction spectroscopy in order to link the structural modifications to their catalytic properties. The results of this study suggest that the main factor modulating the specificity in these enzymes is modification of redox potential of the peroxovanadate.

Biochemical analyses lead with two other proteins identified in the genome of *Z. galactanivorans*. The first protein was characterized as a new VIPO. For the second protein, similar to mammal iodotyrosine deiodinase, the biochemical activity remains to be characterized. *Z. galactanivorans* seems to have several enzymes which oxidize iodide or split C-I bond. In parallel at this work, the localization and speciation of iodine were analyzed by chemical imaging in *Z. galactanivorans* and in the kelp *L. digitata*, known to concentrate highly iodide.

All this information allow to a better understanding of molecular mechanisms involved in the specificity for halide in VHPO and the bacterial origin of these proteins. More generally, these studies assess to understand the role of iodine metabolism in some marine bacteria and there role in biogeochemical cycle of this element.